



Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

“Análisis transcriptómico de hígado de *Cyprinus carpio* en el proceso de aclimatización estacional”

Tesis presentada en la Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, como parte de los requisitos para optar al Grado de **Magíster en Biotecnología.**

Director de Tesis: Dr. Marco Álvarez Santana

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Andrés Bello

Sede Viña del Mar

Ignacio Antonio Ramos Tapia

Santiago, Chile

2017



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

**“Análisis transcriptómico de hígado de *Cyprinus carpio* en el
proceso de aclimatización estacional”**

IGNACIO ANTONIO RAMOS TAPIA

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Marco Álvarez Santana, en el laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Marco Álvarez Santana
Director de Tesis

Dr. Juan Antonio Valdes
Comisión de Tesis

Dr. Jose Pulgar
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE
AÑO 2017

***“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad
y la energía atómica: la voluntad”***

Agradecimientos

Me siento un afortunado y un agradecido de las oportunidades que se me han dado en la vida y también por las que he luchado.

Quisiera agradecer a mi familia, a mis padres Nury y Claudio y a mi hermano Alejandro por todo el apoyo incondicional durante toda mi época universitaria, sin duda son un pilar fundamental en mi desarrollo profesional y sobre todo humano (Infinitas gracias).

En segundo lugar, pero no menos importante a mi flamante Novia y futura esposa Daniela, por la paciencia, el aguante y el apoyo durante el tiempo que duro este trabajo y de seguro que por todo lo que seguirás entregándome en este otro camino que empezamos y que seguro será más difícil que el anterior, pero no por eso menos entretenido.

He aprendido que la vida te da pocos amigos, esos que de verdad se pueden llamar amigos, ya sea del colegio o universidad, de Viña o de Santiago. Siempre tuve a alguien a quien acudir o alguien en quien desahogarme, así que en honor a todos ellos y que saben quiénes son les digo muchas gracias por todo.

Y por último lugar a mi director de tesis, el Profe Marco, que fue crítico con mi trabajo y dispuesto a ayudarme cuando me encontraba perdido, pero además es una gran persona de las que quedan pocas. Solo agradecerle Doc por haberlo conocido y ser su estudiante, y haberlo conocido como persona, sinceramente le deseo lo mejor.

GRACIAS POR LAS RISAS, POR EL APOYO Y POR LAS CERVEZAS HELADAS.

Hasta luego y muchas gracias ; See you later and thank you very much ; So lange und vielen Dank ; 这么久，我非常感谢你 ; Tant et je vous remercie beaucoup ; До мук нип; и велике спасиби ; Até mais, e muito obrigado ; chao que eti bien.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	9
1.1	LOS PECES COMO MODELO DE ESTUDIO.....	9
1.2	LA INFLUENCIA DEL MEDIOAMBIENTE EN LOS PECES.....	9
1.3	EL PEZ <i>CYPRINUS CARPIO</i> COMO MODELO DE ESTUDIO.....	10
1.4	ANTECEDENTES PREVIOS.....	11
1.5	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR FACTORES AMBIENTALES	14
1.6	APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA (RNA-SEQ) EN LA BIOTECNOLOGÍA ACUÍCOLA.....	16
1.7	EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL DURANTE EL PROCESO DE ACLIMATIZACIÓN ESTACIONAL 18	
1.8	HIPÓTESIS	20
1.9	OBJETIVO GENERAL	20
1.10	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2	MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1	MATERIALES.....	20
2.2	MÉTODOS.....	21
2.2.1	<i>Obtención de RNA de carpas aclimatizadas a verano e invierno.....</i>	<i>21</i>
1.1.1	<i>Verificación de RNAs extraídos mediante gel de agarosa</i>	<i>22</i>
2.2.2	<i>Verificación de RNAs extraídos para secuenciación.....</i>	<i>22</i>
2.2.3	<i>Construcción de librerías y Secuenciación.....</i>	<i>22</i>
2.2.4	<i>Control de calidad secuenciación</i>	<i>23</i>
2.2.5	<i>Ensamble del transcriptoma</i>	<i>24</i>
2.2.6	<i>Identificación de DEGs.....</i>	<i>24</i>
2.2.7	<i>Anotación Blast y GO (gene ontology) para DEGs</i>	<i>24</i>
2.2.8	<i>Análisis KEEG</i>	<i>25</i>
2.2.9	<i>Cuantificación de genes candidatos mediante RT-qPCR.....</i>	<i>25</i>
3	RESULTADOS	28
3.1	OBTENCIÓN DE RNA APTOS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA.....	28
3.2	CREACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN DE MUESTRAS.....	28
3.3	DEPURACIÓN DE LIBRERÍAS Y ENSAMBLE DE NOVO	29
3.4	ANOTACION DEL TRANSCRIPTOMA DE <i>CYPRINUS CARPIO</i>	30
3.5	ANÁLISIS DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS	32
3.6	ANOTACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DIFERENCIALMENTE EXPRESADO	34
3.7	CUANTIFICACIÓN DE DEGS MEDIANTE RT-QPCR	36
4	DISCUSIÓN	39
4.1	PROCESOS BIOLÓGICOS RELEVANTES AFECTADOS DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN ESTACIONAL.....	42
4.2	ANÁLISIS DE GENES MEDIANTE RT-QPCR	44
4.3	HIPOXIA ESTACIONAL	47
5	CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	50
	REFERENCIAS.....	51
6	ANEXOS.....	59
6. 1	LISTA DE GENES SOBRE-EXPRESADOS BIOINFORMÁTICAMENTE CON SOFTWARE EDGER EN HÍGADO DE CARPA DURANTE EL INVIERNO.....	59

6.2	LISTA DE GENES SOBRE-EXPRESADOS BIOINFORMÁTICAMENTE CON SOFTWARE EDGE R EN HÍGADO DE CARPA DURANTE EL VERANO.....	63
6.1	VÍAS METABÓLICAS SOBRE-REGULADAS EN VERANO. ANOTACIÓN SEGÚN VÍAS KEGG (KO DE REFERENCIA) UTILIZANDO SOFTWARE BLAST2GO Y KEGG MAPPER.....	68
6.2	VÍAS METABÓLICAS SOBRE-REGULADAS EN INVIERNO. ANOTACIÓN SEGÚN VÍAS KEGG (KO DE REFERENCIA) UTILIZANDO SOFTWARE BLAST2GO Y KEGG MAPPER.....	70
6.3	VARIABILIDAD AMBIENTAL HISTORIA DE LA CUIDAD DE VIÑA DEL MAR, REGIÓN DE VALPARAISO, CHILE.	
	72	

Índice de figuras

FIGURA 1:	ESTRÉS EN EL AMBIENTE QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO.	10
FIGURA 2:	DINÁMICA ULTRAESTRUCTURAL DE LOS COMPONENTES NUCLEOLARES EN HEPATOCITOS DE CARPA ACLIMATIZADOS.	12
FIGURA 3 :	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR LA ACLIMATIZACIÓN ESTACIONAL EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.	15
FIGURA 4:	CLASIFICACIÓN GO (GENE ONTOLOGY) DEL TRANSCRIPTOMA DE CYPRINUS CARPIO PARA TEJIDO HEPÁTICO DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN ESTACIONAL.....	31
FIGURA 5:	HEATMAP DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS.....	33
FIGURA 6:	VOLCANO Y MA PLOTS.	34
FIGURA 7:	ANOTACIÓN BLAST2GO DE SECUENCIAS DEL TRANSCRIPTOMA DIFERENCIALMENTE EXPRESADO.	35
FIGURA 8:	RT-qPCR A GENES DE CYPRINUS CARPIO CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL IN SILICO EN ACLIMATIZACIÓN ESTACIONAL.	37
FIGURA 9:	COMPROBACIÓN RNA-SEQ V/S RT-qPCR.	38
FIGURA 10:	CLIMATOGRAMA CIUDAD DE VIÑA DEL MAR. DATOS MOSTRADOS SON EL PROMEDIO ENTRE LOS AÑOS 1982 HASTA EL AÑO 2012. CLIMATE-MODEL Y CLIMATE-DATA.ORG, LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA OBTENIDA POR OPENSTREETMAP PROYECT.	72
FIGURA 11:	DIAGRAMA DE TEMPERATURA DE LA CIUDAD DE VIÑA DEL MAR. DATOS MOSTRADOS SON EL PROMEDIO ENTRE LOS AÑOS 1982 HASTA EL AÑO 2012. CLIMATE-MODEL Y CLIMATE-DATA.ORG, LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA OBTENIDA POR OPENSTREETMAP PROYECT.	73

Índice de Tablas

TABLA 1:	RESUMEN SECUENCIACION CYPRINUS CARPIO.	23
TABLA 2:	PARTIDORES UTILIZADOS PARA REALIZAR RT-qPCR.	26
TABLA 3:	RQN ELECTROFORESIS CAPILAR (RNA FRAGMENT).	28
TABLA 4:	PARÁMETROS OBTENIDOS LUEGO DE LA SECUENCIACIÓN ILLUMINA MiSEQ DE HÍGADO DE CYPRINUS CARPIO Y POSTERIOR DEPURACIÓN.	29
TABLA 5:	PARÁMETROS OBTENIDOS LUEGO DEL ENSAMBLE DE NOVO DE LAS LECTURAS DE HÍGADO DE CYPRINUS CARPIO UTILIZANDO EL PROGRAMA TRINITY.....	30
TABLA 6:	VALIDACIÓN DE RNA-SEQ ANÁLISIS CON RT-qPCR.....	38

Resumen

Las respuestas de los organismos a las fluctuaciones ambientales son complejas e involucran múltiples factores, lo cual ha complejizado comprender en su totalidad este fenómeno. Es sabido que esta respuesta no es al azar y que se sustenta en una delicada reprogramación a nivel transcripcional, modelando así una respuesta individual adecuada para cada individuo. Por esta razón, y para visualizar de manera global los cambios transcripcionales concomitantes al proceso de aclimatización estacional del pez *Cyprinus carpio* (carpa común), en este trabajo hemos evaluado la reprogramación génica de la carpa a los cambios ambientales mediante análisis de RNA-Seq.

En este trabajo, hemos obtenido información transcriptómica de hígado de carpas aclimatizadas usando secuenciación masiva Illumina MiSeq. Se han obtenido 38.012.838 y 34.620.343 lecturas de verano e invierno, respectivamente. Luego del control de calidad las lecturas fueron ensambladas *de novo* usando el software Trinity, obteniendo un transcriptoma de 239.155 contigs con un N50=1516 pb. Luego de usar la herramienta Blastx con la base de datos de *Danio rerio* (Uniport) se obtuvieron 79.629 genes los cuales fueron anotados funcionalmente mediante el consorcio de GO (Gene Ontology) según Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC). Además, hemos comprobado el análisis bioinformático mediante el uso de RT-qPCR a genes relevantes expresados diferencialmente como APOA1, Prostaglandina D2, RPL4, Vitelogenina y WAP65 obteniendo correlación entre los resultados de RNA-Seq y expresión relativa por PCR cuantitativo.

A partir de la base de datos generada, se revelaron diferentes mecanismos moleculares involucrados en el proceso de aclimatización de la carpa común. Nuestros análisis demostraron que vías metabólicas tales como glucólisis/gluconeogénesis, metabolismo de lípidos, sistema inmune, hipoxia, entre otras, fueron diferencialmente reguladas durante el proceso de aclimatización estacional, poniendo en evidencia la complejidad de los mecanismos de respuesta del organismo de la carpa para enfrentar los cambios medioambientales a los que se encuentra expuesto durante un ciclo estacional.

Summary

The response of organisms to environmental fluctuations is complex and involves multiple factors that are mostly unknown, which has become more complex to fully understand this phenomenon. It is known that this response is not random and that is based on a delicate reprogramming at the transcriptional level, and modeling appropriate individual response to each individual. For this reason, and to display globally transcriptional changes accompanying the process of seasonal acclimatization of fish *Cyprinus carpio* (common carp), in this work we have evaluated the genetic reprogramming of carp to environmental changes by analyzing RNA-Seq.

In this work, we have obtained transcriptomic information from liver of acclimatized carp using massive Illumina MiSeq sequencing. For summer and winter, 38,012,838 and 34,620,343 RNA reads were generated respectively. After the quality control step of reads, these were assembled *de novo* using Trinity software, obtaining a transcriptome of 239,155 contigs with an N50 = 1516 bp. After using the Blastx tool against the *Danio rerio* database (Uniport), 79,629 genes were obtained, which were functionally annotated using the Gene Ontology (GO) consortium according to Biological Process (BP), Molecular Function (MF) and Cell Component (DC). In addition, we have tested the bioinformatic analysis by using RT-qPCR to relevant genes differentially expressed as *APOA1*, *Prostaglandin D2*, *RPL4*, *Vitellogenina* and *WAP65* obtaining a correlation between the results of RNA-Seq and relative expression by quantitative PCR.

From the generated database, different molecular mechanisms involved were revealed in the process of acclimatization of common carp. Our analysis showed that metabolic pathways such as glycolysis / gluconeogenesis, lipid metabolism, immune system, hypoxia, among others, were differentially regulated during the process of seasonal acclimatization highlighting the complexity of the response mechanisms of the carp organism to face the environmental changes that are exposed during a seasonal cycle.

1 Introducción

Durante su existencia, los seres vivos enfrentan una serie de cambios en su medioambiente, lo cual necesariamente obliga a los organismos a desplegar mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares que los ayuden a hacer frente a estos cambios y no ser afectados por la selección natural. El fenómeno global que se desencadena en respuesta a estos cambios ambientales es definido como “aclimatización” (Hochachka y Somero, 2002).

La aclimatización estacional es fundamental para los organismos que enfrentan cambios cíclicos en su ambiente. Frente a esto, todos los organismos poseen una denominada “plasticidad fenotípica” (la cual puede ser muy amplia o reducida), definido como la capacidad de un organismo para hacer frente a cambios en su entorno a través de la regulación de su expresión génica (Fordyce, 2006).

1.1 Los peces como modelo de estudio

Para estudiar procesos complejos tales como la aclimatización y la plasticidad fenotípica, es necesario disponer de un modelo que este sometido a variaciones continuas en su medioambiente. Dicho modelo biológico debiese ser capaz de desplegar rápidas y efectivas respuestas adaptativas frente a las fluctuaciones medioambientales que se le presentan.

En este sentido, los peces son organismos que están expuestos a fluctuaciones continuas en el ambiente donde se desarrollan, debiendo obligatoriamente presentar respuestas compensatorias (Cossins y Crawford, 2005). En particular, los peces están en estrecho contacto con el ambiente que les rodea a través de las branquias y el sistema gastrointestinal, las cuales están constantemente expuestos al agua (Randall et al., 2002). Estas características los hacen un modelo idóneo para estudiar el efecto del ambiente en los organismos.

1.2 La influencia del medioambiente en los peces

Los peces viven en un ambiente con constantes cambios, tanto abióticos (oxigenación, pH, temperatura, etc.) como bióticos (patógenos, depredadores, otros organismos, etc.). Todos estos cambios en el ambiente generan diversos tipos y grados de estrés, tanto agudo como crónico (Schulte 2014). En general, estos cambios alteran la

homeostasis, es decir, la forma que tiene un organismo de mantener sus parámetros internos dentro de márgenes establecidos (Johnson et al., 1992).

Por ejemplo, cambios medioambientales desencadenan cambios a nivel hormonal los cuales actúan como respuesta compensatoria. En vertebrados, se conoce que las exposiciones a estrés generan una activación del sistema simpático con una liberación de adrenalina, la cual a su vez activa las glándulas adrenales, y esta, la liberación de glucocorticoides los cuales son responsables de compensar el estrés sufrido (Moyes y Schulte, 2007).

El estrés ambiental además puede impactar negativamente el “Fitness darwiniano”(Sibly y Calow, 1989) es decir, un cambio ambiental que altere el desempeño de este en forma negativa (Figura 1). Es ahí donde la plasticidad fenotípica juega un rol importante para impedir que este estrés pueda alterar el crecimiento, los procesos metabólicos o la reproducción, entre otros.

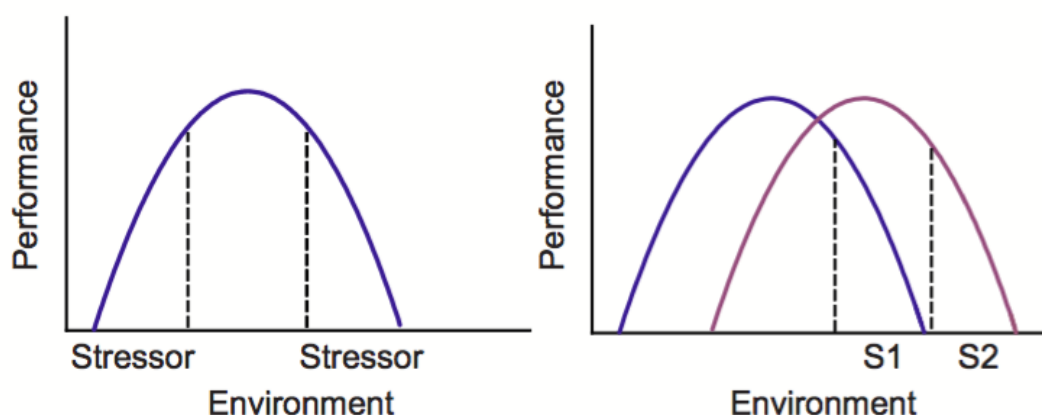


Figura 1: Estrés en el ambiente que afectan el rendimiento.

El panel izquierdo muestra los efectos del medio ambiente sobre el desempeño en un marco inicial de condiciones. La plasticidad fenotípica o aclimatización pueden desplazar la curva de rendimiento de un organismo (o el rendimiento medio de una población) a lo largo del eje x. (panel derecho) de tal manera que un entorno que se experimentó previamente como estresante (S1) ya no resulta en disminuciones en el rendimiento, y en lugar de una nueva gama de entornos (S2) provoca una respuesta de estrés. Imagen extraída de (Schulte 2014).

1.3 El pez *Cyprinus carpio* como modelo de estudio

Cyprinus carpio o carpa común es un pez poiquilotermo de agua dulce que habita en

diferentes regiones del mundo y que gracias a su notable capacidad de adaptación, es un modelo ideal para estudiar procesos como la aclimatización. En Chile, la carpa fue introducida por colonos alemanes alrededor de la década de 1870 (Wolfarth, 1995) y sucesivamente fue colonizando lagos y ríos a lo largo del país.

Existen diversas investigaciones que demuestran la gran capacidad de la carpa para tolerar fluctuaciones en su ambiente tales como pH, temperatura, concentración de oxígeno, períodos de restricción nutricional y variaciones en el fotoperiodo, lo cual hacen de este pez un organismo muy atractivo para el estudio de la aclimatización (Álvarez et al., 2004). Debido a los cambios naturales que la carpa debe enfrentar durante un ciclo anual, debe generar respuestas frente a las fluctuaciones que se le presentan. Sin embargo, en general los parámetros ambientales involucrados son muchos y simultáneos (temperatura, fotoperiodo, oxigenación del agua, nutrientes, etc.), lo cual complejiza y dificulta la total comprensión de los mecanismos involucrados. En consecuencia, el más claro ejemplo de las marcadas fluctuaciones que este pez debe enfrentar en su entorno se resumen en las estaciones de invierno y verano. En general, en la zona central de Chile estas dos estaciones son muy marcadas durante el año, y reúnen una serie de variables que la carpa debe compensar tales como temperatura, fotoperíodo, radiación, disponibilidad alimenticia, entre otras.

1.4 Antecedentes previos

En estudios realizados anteriormente usando el modelo de la carpa, las fluctuaciones medioambientales estacionales muestran un notable impacto a nivel celular y molecular en células hepáticas de carpa. Por ejemplo, a nivel celular, la distribución del glicógeno en el citoplasma de estas células en invierno es claramente diferente a la observada en verano. Mientras en invierno, se observa una gran concentración de glicógeno ampliamente distribuida en el citoplasma, en verano esta concentración disminuye notoriamente. Además, se comprobó una baja síntesis de proteínas en carpas aclimatizadas a invierno versus verano, sugiriendo que la síntesis de proteínas es un proceso clave durante la aclimatización estacional (Sáez et al. 1984)

De igual manera, se observó que durante la época de verano el nucléolo (dominio nuclear encargado de la síntesis y ensamblaje de las partículas ribosomales (Alberts et al.

1996)) posee una estructura de la cromatina más laxa (eucromatina) y componentes nucleolares entremezclados, signos de un nucléolo con una alta biogénesis ribosomal. Por el contrario, en la época invernal, el nucléolo posee una cromatina mucho más compacta (heterocromatina) y componentes nucleolares segregados y rodeados de heterocromatina, signos de un nucléolo con una muy baja biogénesis ribosomal (Alvarez et al. 2006)(Figura 2).

Los cambios en la estructura del nucléolo concomitantes con los cambios ambientales, está íntimamente relacionado con un dramático cambio en la transcripción de los genes ribosomales (Alvarez et al. 2003). Así, los cambios ultraestructurales del nucléolo son concomitantes con un aumento o descenso de la transcripción de los genes ribosomales ya sea en la época de verano o invierno respectivamente (Vera et al. 1997).

En resumen, estos estudios indican que los cambios ambientales tienen un profundo efecto en la biosíntesis ribosomal de la carpa, fundamentalmente en la actividad transcripcional de los genes ribosomales.

Para que los cambios, como la transcripción de los genes ribosomales, sean realizados en la carpa, debe ocurrir un proceso de reprogramación génica, es decir, mecanismos que sean capaces de controlar tanto la expresión como la como la represión de genes claves, en un determinado proceso.

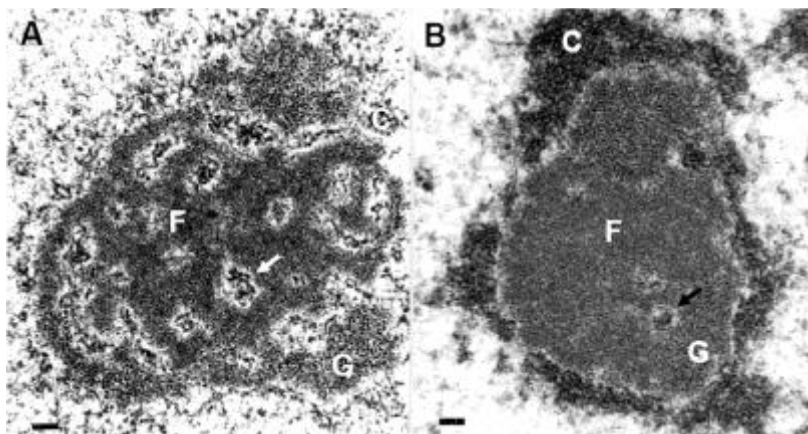


Figura 2: Dinámica ultraestructural de los componentes nucleolares en hepatocitos de carpa aclimatizados.

Verano (A) e Invierno (B). F, componente fibrilar; G, componente granular; C, cromatina perinucleolar. Escala de barra 0,2 μ m (extraído de Álvarez et al, 2006).

En el modelo de aclimatización estacional de la carpa, el rol de los mecanismos epigenéticos ha sido previamente estudiado. Brevemente, los mecanismos epigenéticos son una forma de regulación de la expresión génica que es heredable y no altera la estructura primaria del DNA, es decir, no cambia la secuencia nucleotídica (Inbar-Feíngenber, 2013). Los principales mecanismos epigenéticos lo constituyen: la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de las histonas, RNAs no codificantes, complejos remodeladores de la cromatina e histonas variantes (Handel et al., 2009; Inbar-Feíngenber, 2013).

En este contexto, nuestro laboratorio ha podido establecer que el rol de las histonas variantes en la regulación transcripcional de los genes ribosomales parece ser fundamental. En particular, se comprobó que los subtipos de la variante de histona mH2A (mH2A1 y mH2A2) se depositan de forma antagónica en la cromatina durante la aclimatización estacional. Mientras el enriquecimiento de mH2A1 en el cistrón ribosomal son más altos en invierno, coincidiendo con una disminución de los niveles de rRNA observados, el enriquecimiento de mH2A2 durante verano coincide con altos niveles de rRNA (Araya et al. 2010).

De igual forma, la histona variante H2A.Z también juega un rol relevante en el proceso de aclimatización estacional de la carpa. En particular, la forma ubiquitinada de la histona variante H2A.Z muestra un mayor enriquecimiento en el cistrón ribosomal durante la época de verano cuando la transcripción y el procesamiento de los rRNA es más activo con respecto a invierno (Simonet et al. 2013)

Finalmente, estudios previos han permitido demostrar que durante la aclimatización estacional de la carpa también actúan complejos remodeladores de la cromatina como mecanismo epigenético de respuesta. Interesantemente, hemos detectado la actividad del complejo eNoSC (energy-dependet Nucleolar Silencing Complex), un complejo de silenciamiento nucleolar dependiente de energía celular disponible. Los resultados obtenidos sugieren que el complejo eNoSC estaría involucrado en el silenciamiento de los genes ribosomales durante la aclimatización estacional de la carpa, especialmente inducido durante la época de invierno por un proceso llamado “restricción calórica” (Fernández de la Reguera, 2013). La restricción calórica es asociada con cambios a nivel celular, en especial con cambios a nivel de la cromatina, modulados por una baja energía al interior de la

célula. Es decir, la restricción calórica es una respuesta a nivel celular con cambios en los niveles de expresión de ciertos genes modelando la respuesta hacia la protección celular (Murayama et al., 2008).

En nuestro laboratorio se han registrado los niveles de expresión transcripcional de los componentes del complejo remodelador eNoSC (*sirt-1, nml* y *suv39h1*) en células EPC (línea celular de epiteloma de carpa), demostrándose que estos genes varían su expresión en condiciones de restricción calórica. (Fernández de la Reguera, 2013).

1.5 Cambios en la expresión génica inducidos por factores ambientales

Los organismos responden y se adaptan a cambios ambientales mediante respuestas en el nivel de transcripción de sus genes (Gracey et al. 2004; Wang y Chekanova 2016).

Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado el pez *Cyprinus carpio* cambia la expresión de diversos genes en función de las diferentes épocas del año como respuesta adaptativa (Vera et al., 1997; Álvarez et al., 2001; Molina et al., 2002; Pinto et al., 2005).

La expresión de los genes ribosomales ha sido utilizada como referencia y se ha demostrado que durante la época de invierno en músculo esquelético los genes que componen el complejo remodelador de cromatina eNoSC (*sirt-1, nml* y *suv39h1*), el complejo remodelador de la cromatina NoRC (*tip5* y *ttf-1*) y la histona mH2A1 son sobre-expresados para lograr el silenciamiento de los genes ribosomales y por consecuencia un menor crecimiento muscular. Por el contrario, durante la época de verano los genes anteriores son silenciados logrando la transcripción de los genes ribosomales y con ello un mayor crecimiento muscular (Fuentes et al. 2014). (Figura 3).

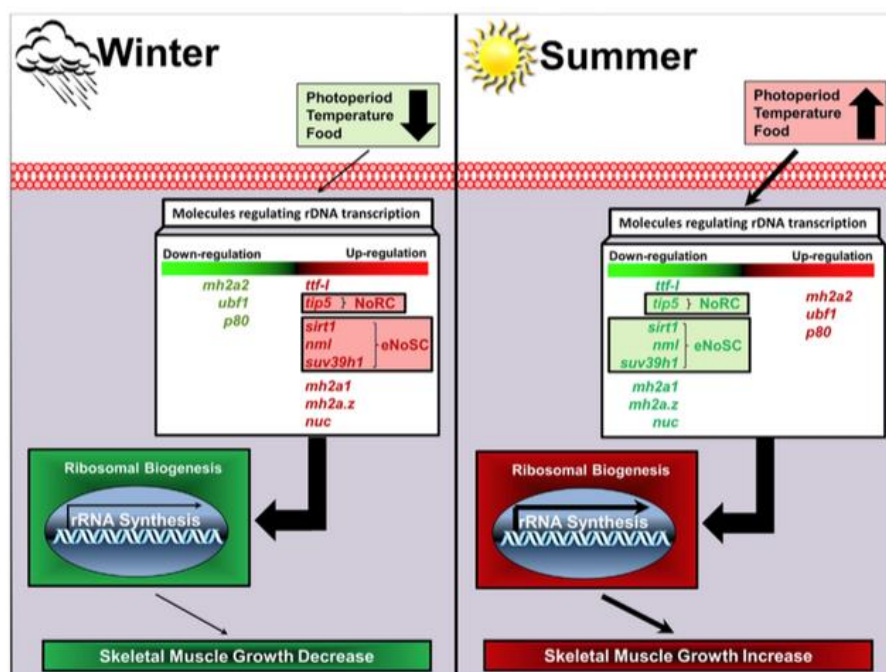


Figura 3 : Cambios en la expresión génica inducidos por la aclimatización estacional en músculo esquelético.

Representación esquemática extraída de Fuentes, et al., 2014.

Consecuentemente, nuestros resultados demuestran inequívocamente que la carpa sufre una reprogramación transcripcional durante su proceso de aclimatización estacional. Asimismo, otros autores han demostrado que *Cyprinus carpio* particularmente modula su expresión génica frente a cambios drásticos de la temperatura (Gracey et al. 2004). En dicho trabajo, se evaluó la expresión transcripcional de carpas aclimatadas a agua fría (17 a 10 °C), lo cual demostró un aumento del nivel de transcripción en genes relacionados con procesamiento del RNA, inicio de la traducción, metabolismo mitocondrial, entre otros (Gracey et al. 2004).

Adicionalmente, Gracey y colaboradores (2004) demostraron que la respuesta a frío de carpas aclimatadas, es esencialmente tejido específica, ya que cada tejido presenta su patrón particular de expresión. Por ejemplo, el tejido muscular esquelético presenta sobre-regulación de genes involucrados con atrofia como ubiquitinas ligasas, proteínas proteolíticas y genes del proteosoma, estos resultados sugieren que el músculo esquelético regula el crecimiento muscular en presencia de bajas temperaturas con el fin de ahorrar energía. Por otro lado, el hígado -un órgano vital para muchos procesos metabólicos-

presenta sobre-regulación de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, sugiriendo que la obtención de energía de las reservas en épocas de frío es fundamental para la sobrevivencia.

Estos cambios claramente confirman una fina reprogramación a nivel genético en respuesta a las bajas temperaturas, pero no contemplan la influencia de otros parámetros ambientales que pueden también ser responsables de la reprogramación génica.

1.6 Aplicación de la tecnología (RNA-Seq) en la biotecnología acuícola

La industria acuícola mundial ha mostrado un gran crecimiento durante los últimos 20 años, tanto en la producción de peces, como también en la de moluscos y crustáceos ¹. Esta industria ha tenido un crecimiento muy grande en Chile. En los años 90 las toneladas de todos los centros de cultivo en el país no superaban las 80.000 toneladas, pero para el año 2004 esto sufrió un crecimiento de más del 800%, superando las 680.000 toneladas de cosecha en los centros acuícolas a lo largo del país.

Durante los últimos años, junto con este desarrollo, se ha intensificado el estudio transcriptómico utilizando RNA-Seq con el objetivo de analizar respuestas en diferentes organismos acuáticos (Jung et al. 2014; Dhanasiri et al. 2013; Yang et al. 2012; Liu et al. 2014).

Un ejemplo está en el área de la inmunología, donde se ha usado esta tecnología para estudiar las respuestas inmunes de los peces a enfermedades de gran impacto económico en la industria. Por ejemplo, en el año 2012 se identificaron 2605 genes involucrados en la infección del pez *Ictalurus spp* por el patógeno *Flavobacterium columnare*. La mayoría de estos genes estaban involucrados en roles críticos tales como el reconocimiento del patógeno, respuesta a estrés oxidativo, apoptosis y vías pro y anti- inflamatorias (Sun et al., 2012). Del total de genes analizados, algunos de estos genes sobre-expresados solo por peces enfermos fueron analizados en profundidad. Se descubrió que, de estos genes, uno que era sobre-expresado 105 veces más que en el control, era un receptor RBL (Rhamnose Binding Lectin, por sus siglas en inglés). Estudios posteriores que se centraron en estos receptores mostraron que los ligandos de estos receptores L-Ramnosa y D-galactosa,

¹ Datos obtenidos de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab825f/AB825F00.htm#TOC>, el día 19 de mayo de 2016.

inyectados en dosis dependientes protegían contra la enfermedad de *F.columnare* (Beck et al., 2012)

En el área de la inmunología, también es importante conocer los mecanismos de defensa del hospedero para así poder generar una efectiva protección. En este ámbito, la técnica de RNA-Seq ha sido usada para investigar los patrones de expresión génica relacionados con la inmunización de pez cebra y lubina europea con vacunas contra *Edwardsiella tarda* y *Vibrio anguillarum*, respectivamente. En el estudio con pez cebra, 4565 genes fueron diferencialmente expresados en hígado luego de la inmunización (2186 sobre expresados y 2379 reprimidos) (Yang et al., 2012). Un análisis más detallado confirmó que los genes que codifican para factores involucrados en el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I) son sobre expresados y los del MHC-II son reprimidos en su transcripción. Estos cambios estarían indicando que las células del pez responden inmunológicamente, ya que al ser *E.tarda* una bacteria intracelular las células presentarían antígenos en su superficie mediante el MHC-I (Yang et al., 2012).

En otro ejemplo de aplicación de esta tecnología, la técnica RNA-Seq ha permitido identificar miRNAs en el músculo del salmón del atlántico (*Salmo Salar*) como potenciales biomarcadores de estrés toxicológico. Kure y colaboradores (Kure et al. 2013) pusieron en evidencia la presencia de 18 miRNAs que son expresados diferencialmente (4 reprimidos y 14 sobre-expresados) como respuesta a agua rica en aluminio.

Finalmente, la aclimatación a un ambiente salino también ha sido estudiada en *Fundulus heteroclitus*, un pez que reside en las costas y en el sur de Georgia (USA) para estudiar genes involucrados en osmoregulacion. Los resultados demostraron que 1177 transcritos son diferencialmente expresados entre los peces aclimatados a ambientes hiposmóticos (peces el sur de Georgia), en donde 979 genes de estos eran compartidos por ambas poblaciones de peces estudiadas, tanto los peces costeros como los del sur de Georgia (Whitehead et al. 2012).

En conclusión, todo indica que el estudio de las respuestas transcripcionales de las especies es de gran importancia para comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares que estas presentan frente a diferentes cambios ambientales. En consecuencia, RNA-Seq es una técnica muy poderosa para el estudio transcriptómico de estas respuestas,

y los conocimientos generados por estas investigaciones pueden permitir el desarrollo de nuevas metodologías que podrían aportar a mejorar la industria acuícola.

1.7 Evaluación de la expresión génica global durante el proceso de aclimatización estacional

Los estudios previos del proceso de aclimatización estacional de la carpa han permitido revelar una serie de cambios a nivel fisiológico, celular y molecular (Araya et al., 2010; Simonet et al., 2013; Fuentes et al., 2014). Los estudios se han centrado en el análisis del fenómeno de aclimatización estacional estudiando el rol de estrategias moleculares específicas frente a los cambios ambientales. Sin embargo, la variedad de estrategias moleculares desplegadas y la complejidad de ellas mismas, no permiten tener una visión global de cómo un organismo completo es capaz de articular una respuesta génica completa.

En consecuencia, nuestro trabajo de tesis propone analizar este proceso mediante un estudio de la expresión génica global de *Cyprinus carpio* durante el proceso de aclimatización estacional, de manera de investigar íntegramente el efecto de los cambios medioambientales en las diversas vías de respuestas biológicas. Este aporte se hará con la creación de un transcriptoma diferencial, el cual tiene como objetivo lograr obtener una visión generalizada de la expresión génica y determinar los mecanismos que la carpa despliega para mantener su homeostasis.

Para el estudio centramos nuestro interés en un órgano fundamental como el hígado. Esta elección está basada en la función metabólica central del tejido hepático, el cual es vital para la mayoría de los organismos. El hígado desempeña labores insustituibles como, secreción de enzimas y acumulación de reservas energéticas, además es metabólicamente muy activo durante toda la vida de un individuo y es capaz de responder rápidamente a los cambios (Dhanasiri et al. 2013; Yang et al. 2012; Du et al. 2014). Asimismo, la mayoría de la información molecular recabada anteriormente por nuestro laboratorio se ha realizado en este órgano (Álvarez et al., 2003; Álvarez et al., 2006; Araya et al., 2010; Simonet et al., 2013), por lo cual disponemos de antecedentes previos que muestran que el fenómeno de aclimatización de la carpa se encuentra reflejado en este órgano.

La generación del transcriptoma diferencial de la carpa se creará creó usando “secuenciación de siguiente generación” por sus siglas en inglés NGS (Next Generation

Sequencing). Este tipo de tecnología ha revolucionado el estudio de la genómica en el último tiempo, puesto que en comparación con el estudio estático del genoma, ha permitido conocer procesos dinámicos tales como el transcriptoma (Qian et al., 2014).

El estudio de la expresión transcripcional se le ha denominado “*RNA-seq*” y posee grandes ventajas además de eliminar desventajas de otras técnicas basadas en microarreglos u otros tipos de secuenciación. Entre las principales ventajas destacan: mayor sensibilidad, menor costo por secuenciación y no se necesita un genoma de referencia (Qian et al., 2014).

Actualmente, la aproximación de *RNAseq* es cada vez más utilizada para el estudio de respuestas moleculares en peces, existiendo estudios transcriptómicos en peces como *Coilia nasus* (Du et al., 2014); *Dicentrarchus labrax* (Sarrapoulou et al., 2012), *Ictalurus spp* (Sun et al., 2012), entre otros. También ha ayudado al estudio tanto en organismos modelos como no modelos, contribuyendo no sólo a mapear y anotar el transcriptoma de ciertos peces, sino también a comprender de mejor forma muchos procesos biológicos tales como biología del desarrollo (Vesterlund et al., 2011), respuesta a estrés por temperatura (Smith et al., 2013) , respuestas inmunológicas (Sun et al., 2012), etc.

Tomando en consideración todo lo anteriormente expuesto, nos propusimos estudiar los procesos de aclimatización estacional de la carpa desde una perspectiva global, para esto realizaremos un transcriptoma mediante la utilización de secuenciación masiva (RNA-Seq). Este estudio busca identificar respuestas tanto moleculares como fisiológicas, desencadenadas por el proceso de aclimatización estacional sufrido por la carpa. Se espera que la información generada a partir de este trabajo permita comprender de mejor forma los mecanismos que sustentan el proceso de adaptación de *Cyprinus carpio*, así como también, que el conocimiento generado pueda ser extrapolado y utilizado en otras especies.

1.8 Hipótesis

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, este trabajo de tesis postula la siguiente hipótesis:

“El proceso de adaptación estacional del pez *Cyprinus carpio* genera respuestas transcripcionales compensatorias a nivel hepático, con transcriptomas característicos en respuesta a los cambios medioambientales de su hábitat”.

1.9 Objetivo General

Evaluar y caracterizar la expresión génica de tejido hepático de *Cyprinus carpio* durante el proceso de aclimatización estacional.

1.10 Objetivos Específicos

- Crear un transcriptoma de tejido hepático de *Cyprinus carpio* para el proceso de aclimatización estacional.
- Obtener transcritos diferencialmente expresados durante la aclimatización estacional.
- Corroborar por RT-qPCR los niveles de expresión de transcritos diferencialmente expresados.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales

- Illumina, secuenciador Miseq250, USA
- Illumina, MiSeq Reagent Kit v3; USA
- Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A., Trizol
- Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A, Kit transcriptasa reversa SuperScript® II
- BioRad, U.S.A, termociclador MyCycler
- Agilent Technologies, SC, U.S.A., Brilliant® II SYBR Green QPCR Master Mix
- Agilent Technologies, SC, U.S.A, Mx3000p termociclador pcr en tiempo real

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de RNA de carpas aclimatizadas a verano e invierno.

Se capturaron carpas tanto hembras como machos, de aproximadamente 1,5 Kg y 45 cm de largo, durante las estaciones de verano e invierno (diciembre-enero y julio-agosto, respectivamente) provenientes de la Laguna Sausalito, Viña del Mar, V Región ([33°00'46"S 71°32'11"O](#)). Se extrajo 50 mg de tejido hepático de carpas aclimatizadas y se realizó la extracción de RNA total. Para ello, se homogenizó el tejido hepático en 1 mL de Trizol 4°C y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego, se tomaron 200µl de cloroformo por cada 1 mL de Trizol utilizado, se agitó vigorosamente por 15 s y se dejó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió lentamente igual volumen de etanol 100% libre de RNAsas y se mezcló por pipeteo. Se cargó la muestra en volúmenes de 700 µl en una columna de recolección RNAeasy (Qiagen kit) y se centrifugó por 30 s a 8000 x g y se descargó el sobrenadante. Se agregó a la columna 350 µl de tampón RW1 (Qiagen kit, USA) y se centrifugó a 8000 x g por 30 s, se descartó el sobrenadante.

Se añadió 80 µl directamente a la columna una solución de DNAsa SET compuesta por, 10 µl DNAsa SET, 70 µl de tampón RDD (Qiagen kit, USA) y se dejó a temperatura ambiente por 15 min., Luego se agregaron 350 µl de tampón RW1, se centrifugó a 8000 x g por 30 s y se descartó el sobrenadante. Luego, se transfirió la columna a nuevo tubo de recolección y se le agregaron 500 µl de tampón RPE (Qiagen kit, USA) y se centrifugó por 30 s a 8000 x g y se descartó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado con 500 µl de tampón RPE se centrifugó por 30 s a 8000 x g y se descartó nuevamente el sobrenadante. Posteriormente, las columnas se centrifugan por 1 min a 8000 x g para retirar el remanente de tampón en la columna. Se trasladaron las columnas a un nuevo tubo de 1.5 mL y se les agregó 50 µl de agua libre de nucleasas directamente en la columna. Se dejaron a temperatura ambiente por 1-2 min y se centrifugaron a 8000 x g por 1 min. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su posterior verificación y/o cuantificación.

1.1.1 Verificación de RNAs extraídos mediante gel de agarosa

A partir del RNA suspendido en agua libre de nucleasas, se procedió a su medición de la concentración en un espectrofotómetro a 260 nm. Luego para observar la integridad de los RNAs extraídos se realizó un gel denaturante 1.2% de agarosa, 1,75% v/v de formaldehído, 1% v/v de MOPS 10X, agua DEPC y 1X de gel red. Finalmente, 1 µg de RNA de cada muestra fue cargado en el gel y se fraccionaron electroforéticamente a 50V. El gel fue analizado bajo un transiluminador UV.

2.2.2 Verificación de RNAs extraídos para secuenciación

Posterior a la extracción de RNAs de tejido hepático, las muestras fueron enviadas bajo una capa de hielo seco para su análisis en Fragment Analyzer (electroforesis capilar), las muestras con un RQN > 6,7 fueron secuenciadas en la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, USA).

2.2.3 Construcción de librerías y Secuenciación

Para la creación de librerías, se utilizó una muestra de 1 µg de RNA de cada carpa (3 individuos por estación) como entrada para el kit de preparación de muestras Illumina® TruSeq RNA LT, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total aislado fue cuantificado con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen), para generar 1 µg de RNA por cada estación, esto se realizó en base a cantidades iguales de las 3 muestras aisladas de tejido hepático. A partir del pool de RNA de invierno y verano se realizó la purificación de mRNA (ARN mensajero), este proceso se basa en la utilización de beads magnéticas unidas a oligonucleótidos de poly-T, para lograr unir específicamente las colas de poli-A en los mRNA. Luego de dos rondas de purificación, se fragmentó el mRNA mediante el uso de una enzima (según instrucciones del fabricante). Seguido a la fragmentación, se realizó la transcripción reversa de los fragmentos de mRNA utilizando random primers, seguido a la generación de la primera hebra se remueve el mRNA templado y se procede a la generación de la hebra complementaria para obtención de cDNA de doble hebra. Seguido de esto, se ligan los adaptadores de Illumina en los extremos de los fragmentos de cDNA de doble

hebra. Después se genera una amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con el fin de enriquecer los fragmentos de cDNA. Finalmente, las bibliotecas finales se analizaron con un kit NGS para Fragment Analyzer, y se cuantificaron mediante Qubit 2.0, utilizando el kit Qubit® DNA BR Assay.

Tabla 1: Resumen Secuenciación Cyprinus carpio.

Primera Corrida MiSeq				Segunda Corrida MiSeq			
R1	17.4 M read	4.5 Gb	85.2% > Q30	R1	20 M read	5.0 Gb	89.0% > Q30
R2	17.4 M read	4.3 Gb	73.1% > Q30	R2	20 M read	5.0 Gb	78.3% > Q30

La secuenciación masiva se llevó a cabo en la plataforma Illumina MiSeq utilizando el kit de secuenciación MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, USA), según especificaciones del fabricante.

Los análisis informáticos realizados a continuación se realizaron con el siguiente hardware:

- Ubuntu 14
- 16 núcleos de procesamiento
- 32 Gb de RAM
- 1 Tb de disco duro de almacenamiento

2.2.4 Control de calidad secuenciación

Se utilizó el software FLEXBAR (Dodt et al. 2012) con los siguientes parámetros para la depuración de la base de las lecturas generadas en la secuenciación:

- Eliminar las lecturas con una calidad inferior a 25 phread (Q=25)
- Eliminar las lecturas con mas de 1 base nucleotídica no leídas (1N)
- Remover las secuencias adaptadoras
- Remover las primeras 15 pares de bases de cada extremo

- Eliminación de lecturas con un largo menor a 50pb (L=50)
- Una lectura debe tener al menos un 70% de ella con calidad mayor o igual a 25 (P=70)

2.2.5 Ensamble del transcriptoma

El ensamble se realizó utilizando el software Trinity Assembly (USA) usando los parámetros entregados por el software sin modificación siguiendo especificaciones de la publicación correspondiente (Haas et al. 2014), línea de comando utilizada:

```
$Trinity --seqType fq --left reads_R1.fq --right reads_R2.fq --CPU 10 --max_memory 10G --min_kmer_cov 2
```

2.2.6 Identificación de DEGs

Para el análisis diferencial de genes, se utilizó el protocolo descrito por Haas y colaboradores (Haas et al. 2014), creado para ser usado en organismos no modelo e importancia ecológica o evolucionaria como es el caso de esta investigación. El protocolo se llevó a cabo sin cambios en las líneas de comando utilizadas.

Esta metodología se basa en la cuenta del número de lecturas de un gen comparándolo con las cuentas del mismo gen en la otra condición, llamado CPM o cuentas por millón de lecturas. Luego de las cuentas y de normalizar por el test TMM (Robinson y Oshlack 2010), se transforman los valores en base a logaritmo de 10, se utiliza el criterio de tasa de cambio proporcional (proporcional fold of change) mayores a 2 y un FDR < 0,001.

2.2.7 Anotación Blast y GO (gene ontology) para DEGs

Se realizó la anotación por homología de secuencias a los DEGs de carpa mediante el uso de la herramienta Blast usando el software Blast2GO con la base de datos publica NCBI² Para ello, se realizó un BlastX a las secuencias DEGs de carpa generadas contra la

² Sitio web consultado el mes de septiembre de 2015 a la través de plataforma Blast2Go:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

base de datos no redundante (NR) utilizando un e-value de 1×10^{-5} . Adicionalmente a la anotación por homología de secuencias Blast, se anotaron funcionalmente los DEGs de carpa por medio de un análisis Blast2GO. Mediante esta herramienta se le asigna una categoría GO (Gen Ontology) a cada una de las secuencias diferencialmente expresadas (Conesa et al., 2005) Las tres categorías GO asignadas corresponden a: proceso biológico (P), función molecular (F) y componente celular (C).

2.2.8 Análisis KEEG

Usando la herramienta KEEG³ (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y utilizando la nomenclatura proporcionada por el software Blast2GO (enzyme ID). Se identificó a los transcritos diferencialmente expresados en vías metabólicas según criterio KO (KEEG Orthology), vías metabólicas referenciales alojadas en esta base de datos.

2.2.9 Cuantificación de genes candidatos mediante RT-qPCR

Se realizó un PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) para cuantificar y validar la expresión *in silico* entregada por el análisis bioinformático de 5 genes candidatos. Los genes seleccionados según su sobreexpresión y número de RPKM más alto en el análisis informático fueron: Vitelogenina, Apolipoproteína A1 (APOA1), Proteína ribosomal L4 (RLP4), Prostaglandina y proteína de aclimatización al calor (WAP65). Para ello, se extrajo RNA de carpas aclimatizadas a invierno y verano, se cuantificó y se evaluó su integridad siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (1.12.1 y 1.12.2). Se utilizó 1 µg de RNA para la síntesis de cDNA, siguiendo las indicaciones del fabricante (SuperScript II, Invitrogen). La determinación de la expresión se realizó mediante RT-qPCR, donde se utilizaron los partidores específicos previamente diseñados (Tabla 1).

³ Sitio web consultado el día 12 de noviembre de 2015:
http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html

Tabla 2: Partidores utilizados para realizar RT-qPCR.

Partidor	Secuencia 5' a 3'	Amplificado (pb)	Pendiente
VitelogeninaFW	AGGCTCAACAGAGTAGCATTTAG	195	-3,555
VitelogeninaRV	GGAGAGATCAGACAGGAGTACA		
APOA1FW	TACATAAACTCCGCCTCCTTTC	190	-4,238
APOA1RV	CTTAGCTGTGTTTGGCCATTAG		
RPL4FW	TCACCGCATTGAGGAGATTC	174	-4,537
RPL4RV	CGGTTCTCATCTTACCCTTAC		
WAP65FW	ACCAGTTATGCTGAGGAAGTG	194	-4,042
WAP65RV	CAGGAGATGTACAGGGCAAATA		
ProstaglandinaFW	TGTGCTGATGTCTGTCCAATAC	203	-2,709
ProstaglandinaRV	CACCCGATCCTAACGTCAATC		
16s FW	GGGGTTTACGACCTCGATGTT	189	-2,730
16s RV	GCTTTAAGTATGGGCCCCCCT		

Primero, para evaluar la especificidad de los partidores y la amplificación de un único producto de PCR se realizó una curva de disociación (*melting curve*) para cada gen con sus respectivos partidores. La reacción consistió en 6 µL de Brilliant® II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, SC, USA.); 0,4 µL de mix de partidores (10 µM); 0,2 µL de ROX (1:500) y 5 µL de pool de cDNA (dilución 1/40). Las condiciones de amplificación fueron de 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 30 s a 95°C y 60 seg a 60°C. Por último, se realizó un ciclo de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C y un gradiente desde 55°C hasta 95°C. Luego, se generó una curva estándar para cada secuencia, con el objetivo de determinar la eficiencia de PCR. La reacción consistió en 6 µL de Brilliant® II SYBR Green QPCR Master Mix, 5 µL de *pool* de cDNA (diluciones seriadas de 10, 100, 1.000, 10.000 y 100.000), 0,4 µL de mix de partidores (10 µM) y 0,2 de ROX (1:500). Las condiciones de amplificación fueron de 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 30 s a

95°C y 60 s a temperatura variable según el gen, luego una extensión final de 10 min a 72°C. Finalmente se cuantificó la expresión de cada gen utilizando las reacciones y programas de PCR anteriormente descritos.

Los datos se analizaron y cuantificaron mediante la fórmula descrita por Michael W. Pfaffl (Pfaffl 2001):

$$\frac{(E_{gen\ candidato})^{\Delta Ct (control - muestra)}}{(E_{16S})^{\Delta Ct (control - muestra)}}$$

Esta fórmula da a conocer la expresión relativa del transcrito del gen en estudio en relación al gen normalizador (en nuestro caso, rDNA 16S mitocondrial de carpa), en donde se combina la eficiencia de la reacción de PCR según los *primers* utilizados ($E = 10^{[-1/pendiente]}$), con el Ct (Cycle threshold) obtenido en cada reacción de PCR para los transcritos de los genes en estudio. “*Slope*” corresponde a la pendiente obtenida en la curva de calibración hecha para cada uno de los *primers* utilizados.

3 Resultados

3.1 Obtención de RNA aptos para secuenciación masiva

Para la obtención de los RNA de carpas aclimatizadas se extrajeron los ácidos nucleicos con el protocolo mixto *Trizol-RNAeasy column* (Ver Materiales y Métodos). Los RNAs extraídos superaron las pruebas de integridad en gel de agarosa denaturante mostrando un patrón consistente de dos bandas, correspondientes al RNA 28S y al RNA 18S, en una razón de 2:1 entre ambos. Posteriormente las muestras fueron enviadas para su análisis por electroforesis capilar (RNA fragment) y su final aprobación para secuenciación, requisito para secuenciación RQN (RNA Quality Number) mayor o igual a 6,7.

La electroforesis (Figura 4) entrega los valores de RQN por muestra (Carriles de C1-C11), los carriles C1, C2, C3, C4, C5 y C10 muestran RNAs de carpas de verano, RQNs: 6,7; 6,1; 6,9; 6,9; 6,6 y 6,8 respectivamente. Carriles C7, C8, C9 y C11 muestras de RNAs de carpas de invierno, RQNs: 7,4; 6,7; 7,3 y 6,4 respectivamente.

Tabla 3: RQN electroforesis capilar (RNA fragment).

Carga de 1 µL de muestra de RNA. Corrida efectiva de las muestras 33 cm a 8kV por 40 minutos.

	Verano						Invierno			
Peces	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
RQN	6.7	6.1	6.9	6.9	6.6	6.8	7.4	6.7	7.3	6.4
Peces Secuenciados (X)	X		X	X			X	X		X

3.2 Creación de librerías y secuenciación de muestras

Luego de haber pasado ambos criterios de integridad de ácidos nucleicos, las muestras fueron utilizados para la creación de las librerías. Se crearon dos librerías una de invierno y otra de verano, cada una de estas a partir de un pool de 3 peces. Ambas librerías fueron secuenciadas y posteriormente fueron secuenciadas nuevamente para obtener una réplica técnica.

La secuenciación dio como resultados un total de 38.012.838 lecturas de invierno con lecturas de 250-350 pb *paired-end* y 34.620.342 lecturas en verano con de 250-350 pb *paired-end*.

3.3 Depuración de librerías y ensamble de novo

Para la limpieza de las librerías se utilizó el software FLEXBAR (Dodt et al., 2012) con los parámetros señalados en materiales y métodos, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 2)

Tabla 4: Parámetros obtenidos luego de la secuenciación Illumina MiSeq de hígado de *Cyprinus carpio* y posterior depuración.

	Invierno	Invierno (replica técnica)	Verano	Verano (replica técnica)
Lecturas restantes	17,485,902 (98.26% lecturas entrantes)	20,526,936 (98.45% lecturas entrantes)	16,130,808 (99.98% lecturas entrantes)	18,489,534 (98,01% lecturas entrantes)
Saltado por presentar solo una lectura	3,253 (0.018% lecturas entrantes)	2,655 (0.012% lecturas entrantes)	2,360 (0.014% lecturas entrantes)	1,304 (0.07% lecturas entrantes)
Recortado por baja calidad	7,810,826 (43.89% lecturas entrantes)	3,769,169 (18.07% lecturas entrantes)	11,531,013 (69.89% lecturas entrantes)	6,374,116 (33.78% lecturas entrantes)
Saltado por cantidad de bases no leídas	145,414 (0.87% lecturas entrantes)	152,318 (0.73 % lecturas entrantes)	258,100 (1.56% lecturas entrantes)	265,392 (1.40% lecturas entrantes)
Saltado por lecturas muy cortas	160,773 (0.90% lecturas entrantes)	166,851 (0.80% lecturas entrantes)	107,070 (0.64% lecturas entrantes)	107,267 (0.57% lecturas entrantes)

Para el ensamble *de novo* del transcriptoma de referencia de *Cyprinus carpio*, correspondiente al ensamble de todas las lecturas generadas durante la secuenciación en ambas estaciones, se utilizó el software Trinity (Haas et al., 2014).

El transcriptoma de *Cyprinus carpio* obtenido es de 239.155 *contigs*, con una media por *contig* de 421 pb, un promedio de *contig* de 835,56 pb, un porcentaje de GC promedio de 44,08% y un total de 199.829.472 pb ensambladas (tabla 3).

Tabla 5: Parámetros obtenidos luego del ensamble de novo de las lecturas de hígado de *Cyprinus carpio* utilizando el programa Trinity.

Total Trinity genes	186.773
Total Trinity transcripts	239.155
Porcentaje de GC (%)	44.08
N50 (pb)	1.516
Largo medio de <i>contigs</i> (pb)	421
Promedio de <i>contigs</i> (pb)	835.56
Total de bases ensambladas (pb)	199.829.472

3.4 Anotación del transcriptoma de *Cyprinus carpio*

Mediante el uso de programa Transdecoder (<http://transdecoder.sourceforge.net/>), se realizó la predicción de las regiones 5' y 3' UTR (*untranslated región*) y del CDS (*coding DNA sequence*) de cada transcrito generado por Trinity. Las secuencias posteriores a la predicción se dividen en dos grupos: transcritos con CDS predicho y transcritos sin CDS predicho. Las secuencias con un CDS predicho fueron anotadas mediante BlastX contra una base de datos de *Danio rerio* de Uniprot (criterio de selección, e-value < 1×10^{-5}). De acuerdo a esta base de datos se clasificaron las secuencias según el consorcio de clasificación ontológica *Gene Ontology* (GO) (Consortium, 2000). Los transcritos se clasificaron según Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC). Para realizar el análisis de enriquecimiento de términos GO del transcriptoma, se utilizó el programa *online* WEGO (Ye et al., 2006) (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>)

3.5 Análisis de genes diferencialmente expresados

Posterior al ensamble del transcriptoma de *Cyprinus carpio*, se utilizó la herramienta edgeR, la cual realiza un análisis de recuento de lecturas por cada estación en busca de *contigs* diferencialmente expresados. edgeR realiza la búsqueda de transcritos diferencialmente expresados y genera volcano plots (Figura 6), en ellos se pueden observar en color rojo los transcritos que tienen una tasa de cambio mayor a 2 con un número de lecturas superior a 1000 y un FDR (false discovery rate) menor a 0,001. Los transcritos que no cumplen los parámetros estadísticos son mostrados en negro.

Se encontró un total de 1325 *contigs* diferencialmente expresados (tasa proporcional de cambio mayor a 2; $p < 0,001$; $FDR < 0,001$) de los cuales 551 *contigs* corresponden a verano. De estos, 179 fueron anotados usando blastx (base de datos no redundante). Por otro lado, 774 corresponden a invierno, de los cuales 141 fueron anotados usando blastx (base de datos no redundante).

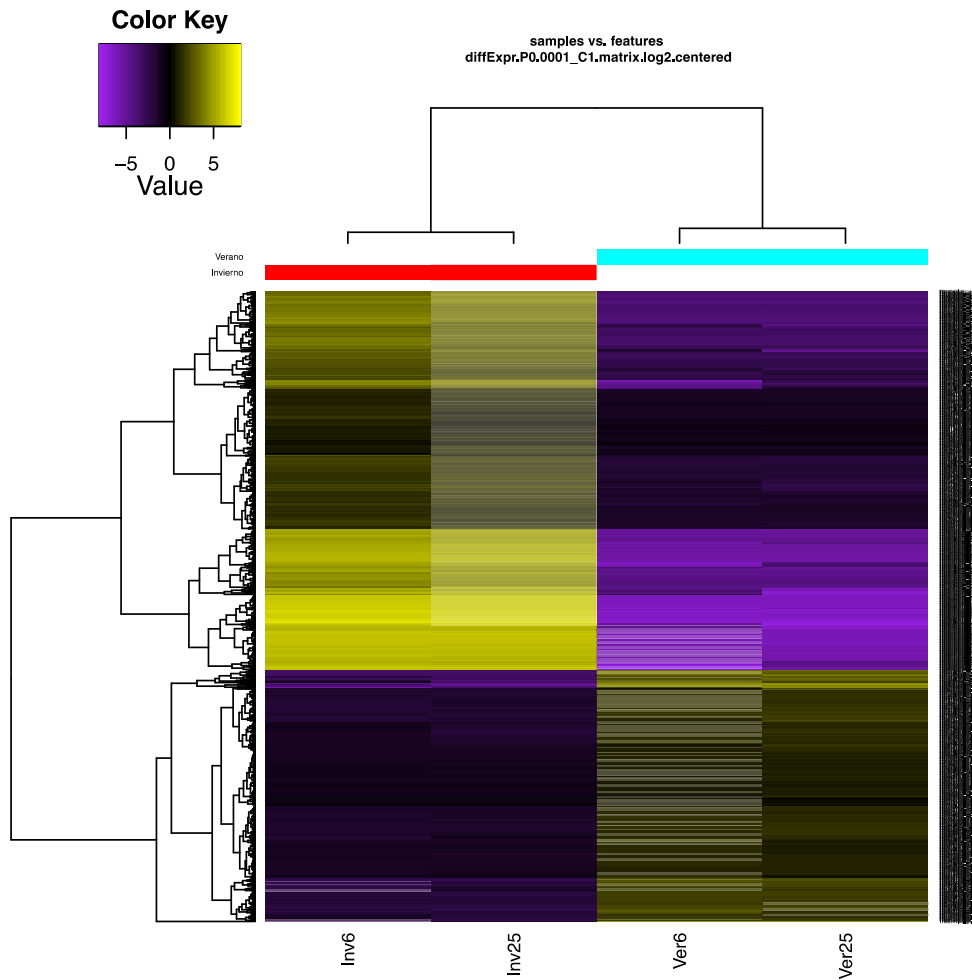


Figura 5: Heatmap de genes diferencialmente expresados.

Bajo la barra roja se muestran los contigs diferencialmente expresados en la época de invierno y bajo la barra celeste contigs diferencialmente expresados en la época de verano. Inv25 y Ver25 corresponden a la secuenciación del 25 de febrero de 2015 e Inv6 y Ver6, corresponden a la secuenciación del 6 de marzo de 2015 (réplica técnica).

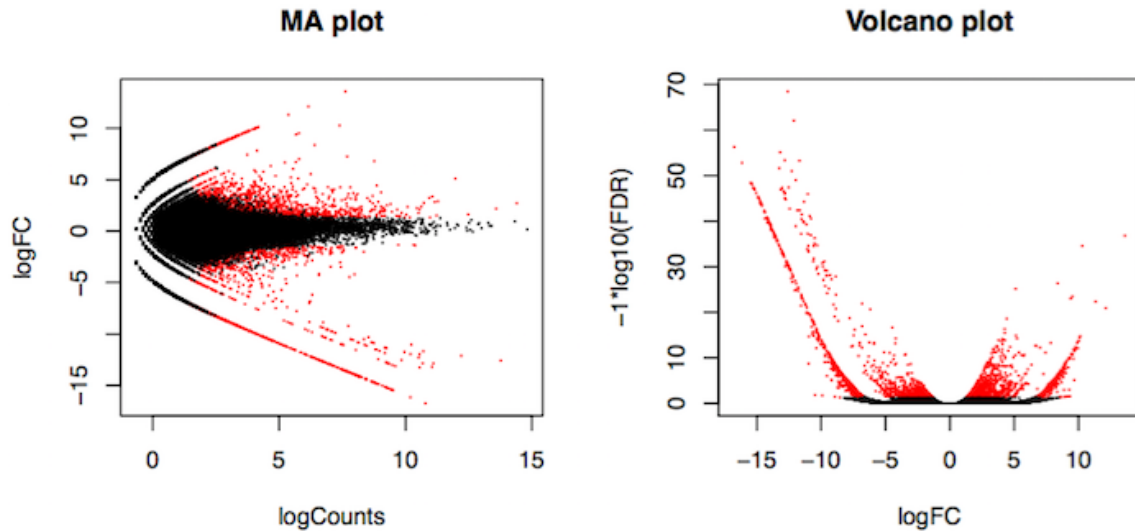


Figura 6: Volcano y MA plots.

Cada punto representa un *contigs* del transcriptoma de referencia de *Cyprinus carpio*. Los puntos negros corresponden a *contigs* que no cumplen con los parámetros estadísticos para considerarse diferencialmente expresados. En rojo, los *contigs* diferencialmente expresados que cumplen con los parámetros estadísticos. ($p < 0,001$; $FDR < 0,001$)

3.6 Anotación del transcriptoma diferencialmente expresado.

Los *contigs* diferencialmente expresados fueron anotados según el criterio Gene Ontology (GO) además de la anotación por homología de secuencias, teniendo los siguientes resultados.

Se observan *contigs* diferencialmente expresados involucrados en respuesta a estímulos, señalización, procesos de sistema inmune y procesos rítmicos, entre otros. En función molecular se observan procesos involucrados en actividad transportadoras, actividad de factores de transcripción y actividad catalítica, entre otros. Finalmente, respecto a las subcategorías relacionadas a componente celular, los términos GO: célula, organelo y complejos macromoleculares son los principales representados en los *contigs* diferencialmente expresados.

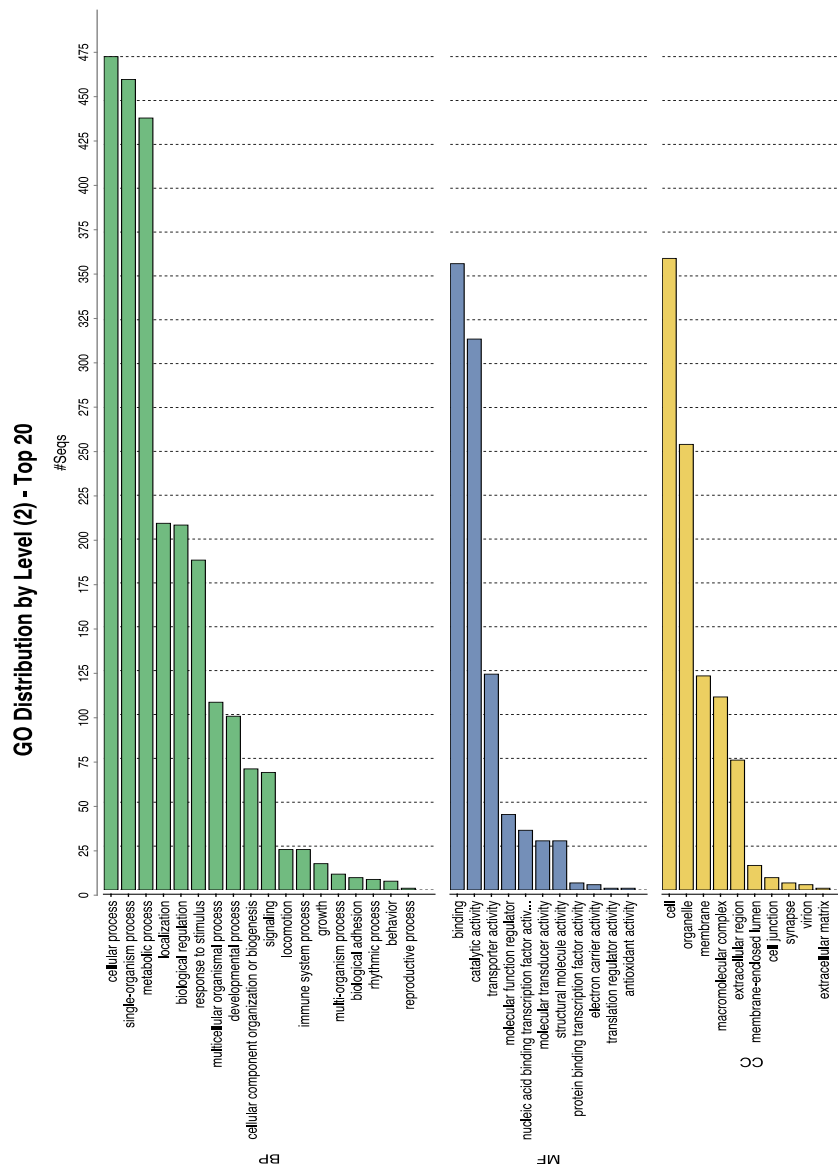


Figura 7: Anotación Blast2GO de secuencias del transcriptoma diferencialmente expresado.

A las secuencias diferencialmente expresadas se le asignó una categoría GO (*gen ontology*) de: Proceso biológico (BP), Función molecular (MF) y Componente celular (CC). Es importante destacar que un mismo *contig* puede estar relacionado a más de una categoría GO.

3.7 Cuantificación de DEGs mediante RT-qPCR

Se evaluó por RT-qPCR la expresión de cinco genes candidatos de *Cyprinus carpio* que se encontraron diferencialmente expresados bajo la aclimatización estacional y que están asociados a diferentes procesos. El número de Individuos utilizados fue de 3 por estación (3 invierno y 3 verano). Los genes elegidos son el contig TR88911|c3_g1_i1 que codifica para vitelogenina, el contig TR50742|c4_g1_i1 que codifica para la apolipoproteína A-1 (APOA1), el contig TR31798|c0_g48_i1 que codifica para la proteína ribosomal L4 (RPL4), el contig TR35307|c0_g1_i1 que codifica para la proteína relacionada a aclimatización a temperatura de 65kDa (WAP65) y al contig TR93180|c0_g1_i1 que codifica para prostaglandina. Las tasas de cambio se muestran en la Figura 8 utilizando el software GraphPrism6 (análisis estadístico t-Test student no apareado), interesantemente solo APOA1 muestra una tendencia a ser mayormente expresada, los otros cuatro genes son significativamente mayores en sus respectivas épocas. Para normalizar la expresión de los genes candidatos se utilizó el gen de referencia 16S mitocondrial (ver materiales y métodos).

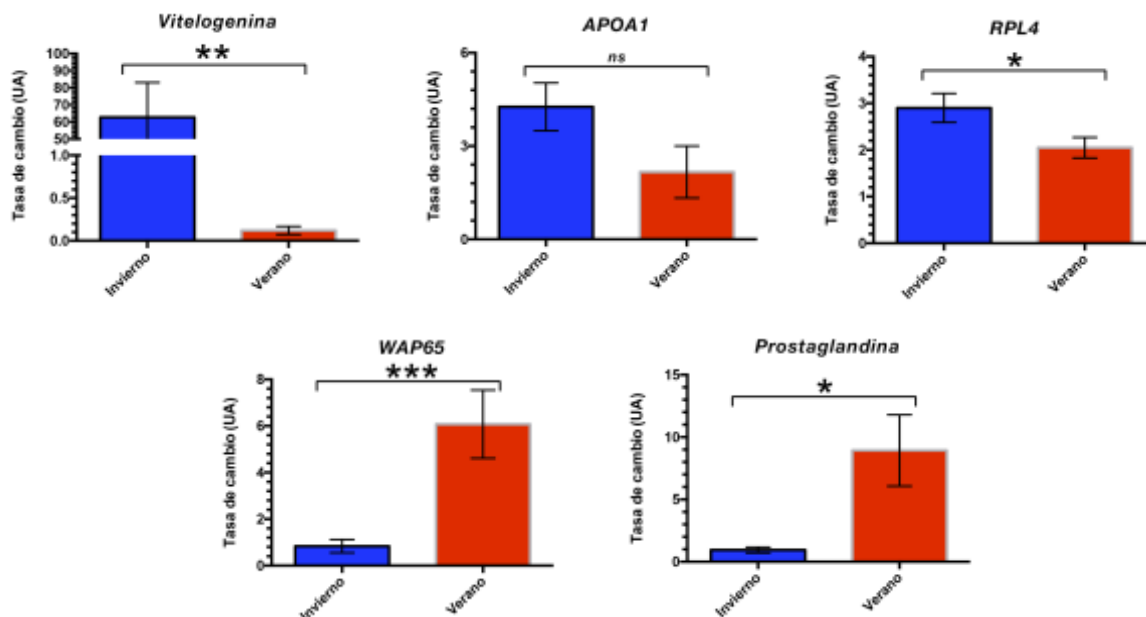


Figura 8: RT-qPCR a genes de *Cyprinus carpio* con expresión diferencial in silico en aclimatización estacional.

Barras rojas muestran la expresión en unidades arbitrarias (UA) en verano y barras azules muestran la expresión en unidades arbitrarias (UA) en invierno. Vitelogenina, Apolipoproteína A1 (APOA1), Proteína Ribosomal L4 (RPL4, proteína de aclimatización al calor (WAP65) y Prostaglandina. Genes con expresión relativa en unidades arbitrarias con respecto al gen constitutivo 16S mitocondrial. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ y ns = no significativo. (t-Test con $n=3$)

Los genes candidatos fueron comparados en sus niveles de expresión relativa (UA) con los datos arrojados por el análisis informático de la técnica de RNA-Seq. Se observa que los genes candidatos muestran el mismo patrón de expresión en ambas técnicas, si bien la magnitud del cambio puede variar como muestran los valores en la tabla 4, como el gen de la vitelogenina en la temporada de invierno, la dirección de esta magnitud no se ve alterada como muestran tanto la Figura 9 como la tabla 4. Si bien los datos cuantitativos de PCR en tiempo real son irremplazables, los datos entregados por el análisis informático de RNA-Seq pueden ser utilizados como una aproximación para futuras hipótesis.

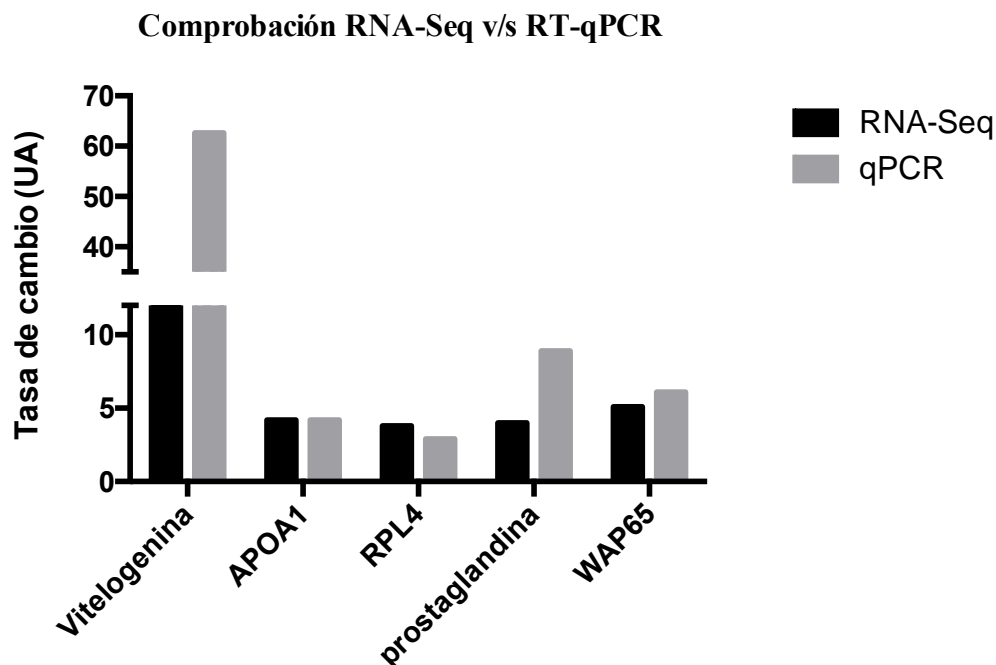


Figura 9: Comprobación RNA-Seq v/s RT-qPCR.

Los genes candidatos (eje x) y la tasa de cambio (eje y), muestran el mismo patrón de expresión que arrojan los análisis de secuenciación, en barras negras análisis por RNA-Seq y en barras grises análisis por RT-qPCR.

Tabla 6: Validación de RNA-Seq análisis con RT-qPCR.

	Expresión relativa (UA)	
	RNA-Seq(I/V) ^a	qPCR(I/V) ^b
Vitelogenina	12,1	62,6
APOA1	4,2	4,2
RPL4	3,8	2,9
prostaglandina	-4,0	-8,9
WAP65	-5,1	-6,1

^a Expresión relativa determinada por análisis del transcriptoma *in silico*

^b Expresión relativa validada por RT-qPCR

(I/V): La expresión relativa de los genes en verano en comparación con invierno.
V:Verano; I:Invierno.

Coefficiente de correlación igual a 0,98886873.

4 Discusión

Cyprinus carpio es un pez que debe implementar una serie de mecanismos para adaptarse a los continuos cambios que se le presentan en el ambiente. Dichos cambios se relacionan con parámetros bióticos como microorganismos, depredadores, entre otros, y abióticos como el pH, la temperatura, la oxigenación, el fotoperiodo, etc, todos estos inherentes de los ecosistemas acuáticos. Es por esto que los esfuerzos para comprender como este organismo es capaz de sobrellevar estas vicisitudes se ha incrementado en nuestro laboratorio, con ello se ha abordado el estudio de mecanismos moleculares adaptativos y su regulación, que emergen y permiten llevar a cabo el fenómeno de aclimatización estacional sufrido por la carpa (Quezada et al., 2006; Alvarez et al., 2006; Alvarez et al., 2007; Araya et al., 2010; Simonet et al., 2013).

En este trabajo hemos abordado la aclimatización estacional desde un punto de vista global y analizando el complejo proceso que sufre este organismo en su ambiente natural. En nuestro laboratorio, el estudio de la aclimatización estacional de la carpa se ha abordado desde diferentes flancos tales como la restricción calórica (Fernandez de la Reguera 2013), el crecimiento muscular (Fuentes et al., 2014), participación de complejos remodeladores de cromatina (Nardocci 2012), entre muchos otros. Sin embargo, nuestros estudios sobre la aclimatización estacional no había sido focalizadas desde un punto de vista global, es decir, como un conjunto de variables ambientales que afectan un conjunto de procesos biológicos en este pez.

Para lograr este objetivo, se utilizó como modelo experimental natural especímenes de carpas aclimatizadas a un lugar geográfico específico (Laguna Sausalito, Viña del Mar, V región, Chile). Este hábitat reúne una serie de factores que permiten estudiar la aclimatización estacional tales como: una marcada temperatura diferencial entre ambas estaciones (Figura suplementaria 2), fotoperiodo diferente entre ambas, precipitaciones (Figura suplementaria 1), pH, etc. Para estudiar como la carpa logra responder y hacer frente a esta serie de cambios en su ambiente, hemos generado un transcriptoma de referencia en tejido hepático durante las estaciones de invierno y verano.

En total, 72.633.189 de lecturas *paired-end* de hígado de ambas estaciones fueron ensambladas *de novo* (sin utilizar un genoma de referencia) para generar un transcriptoma

(verano e invierno) de 239.155 contigs de un tamaño promedio de 835 pb y un N50 1516 pb. El número y tamaño de los contigs junto con el manejo de los datos obtenidos del ensamble *de novo* del transcriptoma de *Cyprinus carpio*, son similares a los obtenidos para otros transcriptomas generados utilizando la misma plataforma Illumina en otras especies piscícolas no-modelo como Pez Gato (Li et al., 2012) o Robalo Europeo (Sarropoulou et al., 2012).

El uso de la tecnología de secuenciación Illumina Miseq fue escogida debido a las múltiples ventajas que presenta con respecto a otras técnicas basadas en otras tecnologías como hibridación u otro tipo de secuenciación (Qian et al., 2014). Otras técnicas de secuenciación no entregan información cuantitativa de la tasa de cambio de un gen, no son capaces de poder identificar isoformas, poseen una baja sensibilidad, están limitadas en la detección de regiones UTRs, entre otras.

El análisis diferencial de genes realizado en este trabajo nos entrega información cualitativa como a su vez cuantitativa, es decir, podemos identificar la secuencia de un transcrito en particular y conocer además cuanto es su tasa de cambio en el proceso de aclimatización estacional, esta última característica no sería posible con un microarreglo que solo nos dice si un gen cambia su expresión en dos sentidos (Incrementa o disminuye) pero no nos da la magnitud de ese cambio. El ensamble *de novo* realizado además ha permitido generar información de isoformas de algunos transcritos (Haas et al., 2013), la cual será de una gran relevancia para estudios posteriores que centren su estudio en un gen en particular y su relevancia en el proceso de aclimatización estacional.

Por último, cabe destacar que, si bien el desarrollo experimental presenta ventajas (como la alta sensibilidad, el uso de un organismo en su ambiente natural, un bajo costo si se excluye el equipamiento, entre otras), también tiene sus limitaciones. Con respecto a este último punto hemos observado que debido a la cantidad de lecturas obtenidas (la cual es inferior a las que se podrían obtener con otra plataforma como HiSeq), ciertos transcritos podrían no estar representados en el transcriptoma creado, por limitaciones de la técnica y la profundidad de esta. Por lo cual, el siguiente paso para comprender el proceso de aclimatización estacional sería el de realizar un estudio con la tecnología HiSeq de

Illumina, la cual posee una mayor generación de lecturas por corrida. La tecnología HiSeq permitirá llevar este estudio a un nivel mas alto, debido a la cantidad de lecturas por corrida de secuenciación que presenta esta tecnología, llegando a generar mas de 50 millones en una sola corrida. Así, se podría lograr un mejor ensamble de un nuevo transcriptoma, además de permitir la identificación de un mayor número de genes diferencialmente expresados y detección de genes que presenten una baja transcripción.

Es importante destacar que trabajar con un organismo completo en su ambiente natural tiene una importancia trascendental con respecto a utilizar otro modelo. Por ejemplo, las conclusiones obtenidas son evidentemente más cercanas a la realidad del proceso que se está estudiando, al incluir todas las variables y sus interacciones en el estudio. En este contexto, si lo comparamos por ejemplo con el uso de animales en condiciones de laboratorio o con el uso de cultivos celulares, estos poseen en muchos casos poca variación genética de los individuos y al ser condiciones controladas en el laboratorio, no involucran otros factores presentes en el hábitat natural de los organismos, lo cual evidentemente puede inducir a errores en la interpretación de los resultados. Sin embargo, hay que también precisar que trabajar con un organismo completo también tiene desventajas, tales como no tener control sobre el ambiente, sobretodo en largos tiempos de ensayo (como lo es el ciclo estacional).

En el análisis del transcriptoma de *Cyprinus carpio* durante el proceso de aclimatación estacional hemos observado que las vías metabólicas y ciertos genes involucrados con estrés por contaminación por xenobióticos fueron sobre-regulados particularmente en la temporada de verano. Esto nos lleva a sospechar que, durante esta época del año, la carpa está sometida a un estrés por este tipo de contaminación. Por ejemplo, el transcrito de la glutathione-s-transferasa es uno de los genes sobre-regulado en la carpa, lo cual es consistente con lo reportado en *Danio rerio*. En este caso, los autores identifican a este gen y lo relacionan con respuesta por contaminación por xenobióticos, en particular reduciendo la reactividad de los componentes e incrementando la solubilidad de estos en agua para su posterior eliminación (Glisic et al., 2015).

Sin perjuicio de lo anterior, y en el entendido que la contaminación puede resultar de una intervención humana no natural (y a su vez ser circunstancial), el análisis de nuestros

resultados y conclusiones estarán dirigidos más en profundidad respecto a mecanismos biológicos globales que afectan a la carpa, y que podrían explicar el fenómeno de adaptación natural.

4.1 Procesos biológicos relevantes afectados durante la aclimatización estacional.

Durante el proceso de aclimatización estacional, la carpa enfrenta una serie de cambios en su ambiente los cuales obligatoriamente hacen cambiar su balance interno. En consecuencia, la gran plasticidad fenotípica que posee la carpa juega un papel clave en el transcurso de este proceso. El análisis de las vías metabólicas de *Cyprinus carpio* durante el proceso de aclimatización estacional demostró que en invierno ciertos genes relacionados con la inhibición de la apoptosis, vías metabólicas como reparación por excisión de bases, reparación por DNA dañado y reparación por no coincidencia de bases (Anexos: Tabla N°1) se ven incrementados. Estos resultados podrían sugerir que bajo estas condiciones se podría producir una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales podrían estar causando daños en el DNA de la carpa. Como consecuencia, se inhibiría la apoptosis celular e incrementaría la transcripción de genes necesarios para la adecuada compensación de la carga ROS. Esto sería crucial, puesto que estas especies reactivas causan daños estructurales en un gran variedad de macromoléculas en todos los organismos que viven en ambientes aeróbicos (Hattem et al., 2014). En estudios previos, se ha observado que bajo la inducción de bajas temperaturas, las respuestas comunes son la expresión de genes envueltos en protección contra radicales, proteínas chaperonas y apoptosis (Gracey et al., 2004).

En este mismo sentido, también se ha detectado la inducción de genes por efecto de estrés por hipoxia (Gracey et al., 2004). Nuestros resultados demostraron que durante verano existe una sobre-regulación del gen HIF, factor clave de respuesta a hipoxia. Esto estaría indicando que durante la estación estival existe una menor concentración de oxígeno que causaría la hipoxia en la carpa. Por el contrario, durante el invierno, la concentración de oxígeno estaría incrementada permitiendo un escenario propicio para la producción de especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, nuestro análisis permitió revelar que vías relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos están sobre-reguladas en verano. Previamente, se ha reportado que cambios en el metabolismo de ácidos grasos son consistentes con una reestructuración de la membrana plasmática de las células durante adaptación (Hazel y Williams 1990). En este contexto, podríamos inferir que la carpa en verano sobre-regularía los genes relacionados con el metabolismo de lípidos, de manera tal que durante esta época del año la membrana celular posea la fluidez adecuada en estas condiciones. Por el contrario, estas vías se encuentran disminuidas en su expresión en invierno, la reestructuración de la membrana por parte de lípidos como el colesterol, sería esencial por parte del organismo en las épocas con menores temperaturas (Gracey et al., 2004). Transcriptomas recientes de carpas aclimatadas a bajas temperaturas muestran que genes involucrados con respuesta inmune son sobre expresados durante largo tiempo en diferentes órganos, incluido el hígado. Se sugiere que esto daría a la carpa una fuerte inmunidad durante los meses de mas frio como estrategia de supervivencia para los meses mas cálidos (Liang et al., 2015).

En el transcriptoma diferencial generado en esta tesis, se encontraron en invierno sobre-regulados genes de la vía fosforilación oxidativa. En particular, se destacaron genes relacionados con el complejo IV de la cadena transportadora de electrones tales como citocromo C oxidasa (subunidad I, II, III y IV). Este resultado es concordante con el estudio reportado por Gracey y colaboradores, en los cuales diferentes tejidos evaluados (riñón, hígado, cerebro, músculo y branquias) mostraron una mayor sobre-regulación de genes involucrados en la generación de energía (ATP traslocasa 2 y 3, proteínas transportadoras de fosfato, ATP sintetasa, flavoproteínas transportadoras de electrones alfa y beta). Esto permitió sugerir que las bajas temperaturas tendrían una influencia en la producción de ATP por parte de la célula (Gracey et al., 2004). Si bien no se saben las razones por las cuales las bajas temperaturas estarían influyendo en la producción de energía, esto parece sugerir que la mayor fosforilación oxidativa y el aumento de la vía de las pentosas fosfato (Tabla N°2) estarían favoreciendo el metabolismo de lípidos.

En general, la época invernal involucra entre otros factores una baja disponibilidad de alimento. A la inversa, la época de verano supone una disponibilidad de alimento mayor.

Uno de los procesos más relevante para cualquier célula durante su desarrollo es el uso de las fuentes de energía, es decir, como esta administra las fuentes de carbono para producir energía para su metabolismo interno (Lodish y Berk 2008). Durante nuestro trabajo hemos observado que genes relacionados con la vía glucólisis/gluconeogénesis se han visto alterados en el proceso de aclimatización estacional. Durante la época invernal, los genes involucrados en la vía glucólisis/gluconeogénesis: glucoquinasa, fructosa 1-6 bifosfato, aldolasa clase 1 y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, se observaron sobre-regulados, lo que permite sugerir que durante la estación invernal se ve favorecida la generación de glucosa para su posterior utilización. Por el contrario, en el transcriptoma realizado en esta tesis se encontró que durante la época de verano los genes PGA mutasa, piruvato deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa involucrados en la vía glucólisis se encontraron sobre-regulados lo cual sugiere que se vio favorecida la utilización de glucosa para crear piruvato y llevarlo así al ciclo de Krebs.

En estudios realizados en *Spaurus aurata*, cuando hay temperaturas bajas y escases de alimento, se agotan las reservas de glicógeno y la oxidación de ácidos grasos no es capaz de suplir la demanda de glucosa (Mininni et al., 2014). Por esta razón, y observando los resultados obtenidos en esta tesis, da pie a suponer que la carpa favorece la expresión de estos genes para suplir la demanda energética. Estudios posteriores son necesarios para obtener claridad respecto a si los transcritos vistos en nuestro trabajo son traducidos y hay presencia de las proteínas correspondientes en hepatocitos de carpa.

Los datos anteriores concuerdan con los resultados obtenidos en relación con la vía de metabolismo del piruvato, la cual se encuentra más activa (mayor cantidad de genes sobre-regulados) en la época de verano que en la época de invierno. Esto permite sugerir que se genera más piruvato en la época de verano al poseer mayor glucosa disponible, por el contrario, durante la época de invierno la vía estaría disminuida transcripcionalmente.

4.2 Análisis de genes mediante RT-qPCR

Los genes incluidos en el análisis de expresión mediante la técnica de RT-qPCR son de vital importancia para la comprobación del trabajo realizado informáticamente. Estos análisis fueron realizados en individuos correspondientes al 2015, mientras los individuos

secuenciados fueron del año 2014, esto se realizó con la finalidad de confirmar que la respuesta transcripcional es conservada de un pez a otro y que las respuestas transcripcionales observadas en este trabajo podrían ser conservadas de un proceso de aclimatación estacional a otro. Estos transcritos fueron seleccionados debido a que poseen una tasa de cambio y cantidad de lecturas suficientes para facilitar la realización del experimento de qPCR.

Los resultados de este trabajo muestran una mayor expresión del gen de vitelogenina durante la época invernal (60 veces más transcrito del gen de la vitelogenina en invierno que en verano, Figura 8). La vitelogenina es precursor de los huevos en los vertebrados incluyendo anfibios, reptiles, aves y peces. esta proteína es sintetizada en el hígado en los vertebrados (Yang et al., 2016). Esta proteína se genera principalmente en hembras, sin embargo, hay pequeñas cantidades de vitelogenina en machos. Esto sugiere que podría jugar un rol independiente del sexo del organismo (Liu et al., 2011), además se ha descrito que en otros peces la vitelogenina participa en procesos inmune (García et al., 2010; Tong et al., 2010) y estudios el efecto de la temperatura en los peces se sabe que aumentos en la temperatura como la estación de verano observada en este trabajo la vitelogenesis se afectada negativamente (Pankhurst et al., 1996; Im et al., 2016). Al haber tomado muestras de 2 hembras y 1 macho para la realización del RT-qPCR podríamos atribuir el aumento de transcripción del gen de la vitelogenina a las hembras estudiadas, sin embargo, no es posible descartar que esta juegue otro rol además de ser precursor de los huevos como por ejemplo proveer inmunidad ante una infección bacteriana (Tong et al., 2010).

La biogénesis ribosomal es un proceso vital para los organismos vivos, ya que de ella se desprende la generación de ribosomas y la posterior síntesis de proteínas (Álvarez et al., 2004). Trabajos anteriores realizados en el laboratorio comprueban que la transcripción de los genes ribosomales es menor en carpas aclimatizadas a invierno (Alvarez et al., 2007; Alvarez et al., 2003). Sin embargo, durante la realización de los análisis de RT-qPCR el gen de la proteína ribosomal 4 (*RLP4*) fue sobre regulado en su expresión en la época de invierno (Figura 8), por lo que difiere de la coordinación de la biogénesis ribosomal, en donde si los genes ribosomales que dan lugar a los RNA ribosomales (rRNA) son reprimidos por consiguiente la transcripción de los genes que codifican para las proteínas

ribosomales debería seguir un patron similar. En estudios anteriores han descubierto que *RLP4* es un regulador de la proteína *p53* incrementando la expresión del gen (He et al., 2016) y la síntesis de la proteína en la célula, *p53* a su vez es capaz de inhibir la transcripción de la RNA polimerasa I (Zhai y Comai 2000) y por consiguiente inhibiendo la transcripción de los genes de ribosomales (Budde y Grummt 1999), por lo que la disminución en la transcripción de los genes ribosomales se explicaría debido a la acción represora de *p53* sobre la pol I que es la encargada de la transcripción de los rRNA.

El gen de la proteína WAP65 fue sobre regulado en la época de verano y analizado mediante PCR cuantitativo. WAP65 es una proteína identificada inicialmente en pez dorado en el hepatopáncreas (Kikuchi et al., 1995). este gen se ha visto sobre expresado en peces en condiciones de incremento de temperatura principalmente (Im et al., 2016), sin embargo, a travez de los años se han descubierto otras condiciones en donde su transcripción se eleva, como respuesta a metales pesados (Pierre et al., 2011) y respuestas inmunes (Diaz-Rosales et al., 2014), este ultimo debido a que al capturar hierro libre del torrente sanguíneo este queda fuera de disposición para futuras bacterias circulantes. La sobre regulación en la expresión de WAP65 se explicaría debido al alza de temperatura provocada principalmente por la época de verano, aunque no se podría descartar que existieran metales pesados o una respuesta inmune de la carpa, tomando en cuenta las otras condiciones de respuesta de este transcrito.

El gen de Prostaglandina D2 sintasa cumple la función de sintetizar prostaglandina H2 a prostaglandina D2 (Kawaguchi et al., 1995). Estas proteínas cumplen el rol de respuesta inmune a multiples niveles concertando ligandos, citoquinas y otros muchos factores (Simmons et al., 2004). El gen de la prostaglandina fue sobre regulado en la temporada de verano, teniendo en cuenta el proceso de aclimatizacion estacional y el fenómeno de posible hipoxia estacional de la carpa por aumento de la concentración de microorganismos en su hábitat la prostaglandina podría estar siguiendo la casacada de señalización de respuesta a multiples microorganismos que se encuentran suspendido en el agua de la Laguna Sausalito. Estudios anteriores han postulado al gen de la prostaglandina como biomarcador de estrés químico peces, ya que un trabajo relaciono la presencia de polimorfismos en 5 comunidades de *Platichthys flesus* con la presencia de químicos y

pesticidas, teniendo en cuenta el lugar de estudio y los comentarios anteriores hay una gran posibilidad que la carpa este bajo un proceso de estrés por químicos en la laguna sausalito.

El ultimo gen analizado fue el de la Apolipoproteína A1 fue el único ensayo que no mostró una diferencia significativa en la tasa de expresión de dicho gen. Aun así, el gráfico marca una tendencia a sobre regular el gen en la época de invierno. Trabajos anteriores realizados por el laboratorio muestran expresión de este gen en tejido hepático (Concha et al. 2005) y otros trabajos han detectado sobre regulación de genes de apolipoproteínas (APOA1, APOA4, APOB, APOC2, APOE, y APO28kDa) cuando carpas son aclimatadas a baja temperatura (Gracey et al. 2004).

Como se sabe por literatura anterior realizada en el laboratorio la síntesis de proteínas es mayor en la época de verano que en invierno. sin embargo, se ha visto que en carpas aclimatadas a invierno la concentración de APOA1 en tejido hepático es aproximadamente el doble que en verano (Inostroza et al., 1990). El estudio de Inostroza y Cols (1990) refuerza lo encontrado en los análisis de este trabajo ya que se ha encontrado que la transcripción del gen de la APOA1 marca una tendencia a ser sobre regulado en invierno donde existen bajas temperaturas (no significativo), aunque no se puede descartar que el aumento en la producción de proteína en la época invernal mostrado por el trabajo de Inostroza (1990) sea debido a una regulación post-transcripcional y que el aumento de transcrito no influya en la mayor traducción de proteína.

4.3 Hipoxia estacional

Otro hecho relevante ha sido observado en los resultados de DEGs, durante la época de verano, en donde el gen Hif-3 (Factor Inducible por Hipoxia) se ha visto sobre-regulado con respecto al invierno. Este factor se ha descrito como un indicador de hipoxia en estudios realizados en *Danio rerio* (Robertson et al., 2014), una especie estrechamente relacionada filogenéticamente con la carpa. En especial el gen Hif-3 es sobre-regulado en condiciones de hipoxia y degradado en condiciones de normoxia, Hif-3 bajo condiciones de hipoxia se une a promotores de genes blanco regulando su expresión, por lo tanto los resultados sugieren que Hif-3 seria un factor de transcripción dependiente de oxígeno con

la posibilidad de activar diferentes respuestas transcripcionales en hipoxia (Zhang et al., 2014).

Esta diferencia de expresión indicaría que, durante la época de verano, la concentración de oxígeno disuelto en el agua estaría bajo las concentraciones óptimas de oxigenación para la carpa. Se conoce que los aumentos de temperatura en el agua disminuyen la concentración de oxígeno en el agua, quizás debido a la mayor cantidad de organismos y microorganismos favorecidos por un aumento en la temperatura ^(4,5).

Contrariamente a lo que está descrito, la sobre-regulación de genes HIF está asociado al control de mecanismos que favorecen la captación de oxígeno y disminuyen procesos que conlleven una alta demanda de este. Factores tales como IGFBP-1 (Proteína de unión al Factor de Crecimiento Asociado a insulina tipo 1), la hormona eritropoyetina con la regulación hematopoyética y el factor de crecimiento endotelial vascular de citoquinas son procesos que en condiciones de hipoxia son disminuidos en su expresión, debido a su alto impacto en el consumo de oxígeno (Robertson et al., 2014). Hemos observado que en la época de verano IGF1 es sobre-regulado (Anexos: Tabla N°2), contrario a lo descrito previamente en la literatura, donde IGF1 es disminuido en su expresión, en condiciones con baja concentración de oxígeno, para disminuir el consumo energético (Robertson et al., 2014). En mamíferos (*Sus scrofa domestica*), se ha encontrado que IGF1 es regulado transcripcionalmente por la unión de una proteína llamada “CCAAT/enhancer-binding protein”(CEBP), la cual posee sitios de unión al promotor de IGF1 aumentando su expresión (Tang et al., 2015). El transcrito que codifica para CEBP en carpa fue sobre-expresado en invierno (razón de cambio 3,6, FDR<0,001) en conjunto con IGF1 en la carpa, lo que sugiere que este factor de transcripción regularía positivamente la expresión de IGF en hígado de carpa similar a lo encontrado en mamíferos (Tang et al., 2015).

Las implicancias de que el gen HIF no desencadene la represión de IGF en condiciones de hipoxia en *Cyprinus carpio* no son comprendidas, pero podrían estar implicadas con la gran plasticidad fenotípica atribuida a la carpa.

⁴ Sitio visitado el 17 de diciembre de 2015: <http://water.usgs.gov/edu/dissolvedoxygen.html>

⁵ Sitio visitado el 17 de diciembre de 2015: <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/dissolved-oxygen/#6>

Por otro lado, previamente nuestro laboratorio reportó en carpa que IGF1 al interactuar con sus receptores en el músculo esquelético produce la transcripción de AKT y P70S6K los cuales activan una cascada de señalización que termina regulando la transcripción de los genes ribosomales y genes relacionados con crecimiento muscular (myod, myf5 y myog). Por consiguiente, el crecimiento del tejido muscular de carpa en verano según los resultados de Fuentes y cols. y nuestros propios resultados obtenidos en el presente trabajo indican que CEBP podría estar activando IGF1 hepático para promover el crecimiento muscular. Sin embargo, estudios posteriores son necesarios podrán poder explicar de manera más clara la regulación de IGF1 durante el proceso de aclimatización estacional y su posible vinculación con CEBP u otros reguladores en peces.

5 Conclusiones y proyecciones

El estudio de la respuesta transcripcional de la carpa durante el proceso de aclimatación estacional nos ha llevado a comprender de mejor forma como este organismo es capaz de responder a variables ambientales.

Durante esta tesis hemos logrado crear un transcriptoma de 239.155 secuencias de hígado de carpa. Esta herramienta ha sido fundamental para este estudio y lo será también para estudios posteriores que profundicen en el análisis de los procesos biológicos que se desencadenan en la carpa durante la aclimatación estacional.

Hemos logrado observar con el análisis de datos que este organismo logra crear un nuevo balance energético. Diferentes vías y ramas de estas mismas son activadas o reprimidas para poder compensar las variables ambientales que la carpa esta enfrentando.

Así queda de manifiesto, que la aclimatación estacional sufrida por la carpa no es un proceso al azar, este conlleva una serie de cambios a nivel transcripcional, dirigidos a realizar un balance para las condiciones ambientales presentes y así lograr una homeostasis de la carpa.

Referencias

- Alvarez, M, C Quezada, C Navarro, a Molina, P Bouvet, M Krauskopf, and M.I Vera. 2003. "An Increased Expression of Nucleolin Is Associated with a Physiological Nucleolar Segregation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (1): 152–58. doi:10.1016/S0006-291X(02)02978-9.
- Álvarez, Marco, Alfredo Molina, Claudia Quezada, Rodrigo Pinto, Manuel Krauskopf, and María Inés Vera. 2004. "Eurythermal Fish Acclimatization and Nucleolar Function: A Review." *Journal of Thermal Biology* 29: 663–67. doi:10.1016/j.jtherbio.2004.08.036.
- Alvarez, Marco, Gino Nardocci, Marc Thiry, Rodrigo Alvarez, Mauricio Reyes, Alfredo Molina, and M Ines Vera. 2007. "The Nuclear Phenotypic Plasticity Observed in Fish during rRNA Regulation Entails Cajal Bodies Dynamics." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 (1): 40–45. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.217.
- Alvarez, Marco, Claudia Quezada, Alfredo Molina, Manuel Krauskopf, M Ines Vera, and Marc Thiry. 2006. "Ultrastructural Changes of the Carp (*Cyprinus Carpio*) Hepatocyte Nucleolus during Seasonal Acclimatization." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 98 (8): 457–63. doi:10.1042/BC20060006.
- Araya, I, G Nardocci, Jp Morales, Mi Vera, a Molina, and M Alvarez. 2010. "MacroH2A Subtypes Contribute Antagonistically to the Transcriptional Regulation of the Ribosomal Cistron during Seasonal Acclimatization of the Carp Fish." *Epigenetics & Chromatin* 3: 14. doi:10.1186/1756-8935-3-14.
- Budde, a, and I Grummt. 1999. "P53 Represses Ribosomal Gene Transcription." *Oncogene* 18 (4): 1119–24. doi:10.1038/sj.onc.1202402.
- Concha, Margarita I, Rodrigo López, Julieta Villanueva, Nadya Báez, and Rodolfo Amthauer. 2005. "Undetectable Apolipoprotein A-I Gene Expression Suggests an Unusual Mechanism of Dietary Lipid Mobilisation in the Intestine of *Cyprinus Carpio*." *The Journal of Experimental Biology* 208 (Pt 7): 1393–99. doi:10.1242/jeb.01512.
- Conesa, A., S. Gotz, J. M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon, and M. Robles. 2005. "Blast2GO: A Universal Tool for Annotation, Visualization and Analysis in Functional Genomics Research." *Bioinformatics* 21 (18): 3674–76.

doi:10.1093/bioinformatics/bti610.

- Consortium, The Gene Ontology. 2000. "Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology." *Nature Genetics* 25 (1): 25–29. doi:10.1038/75556.Gene.
- Dhanasiri, Anusha K S, Jorge M O Fernandes, and Viswanath Kiron. 2013. "Liver Transcriptome Changes in Zebrafish during Acclimation to Transport-Associated Stress." *PloS One* 8 (6): e65028. doi:10.1371/journal.pone.0065028.
- Diaz-Rosales, P., P. Pereiro, A. Figueras, B. Novoa, and S. Dios. 2014. "The Warm Temperature Acclimation Protein (Wap65) Has an Important Role in the Inflammatory Response of Turbot (*Scophthalmus Maximus*)." *Fish and Shellfish Immunology* 41 (1). Elsevier Ltd: 80–92. doi:10.1016/j.fsi.2014.04.012.
- Dot, Matthias, Johannes Roehr, Rina Ahmed, and Christoph Dieterich. 2012. "FLEXBAR—Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms." *Biology* 1 (3): 895–905. doi:10.3390/biology1030895.
- Du, Fukuan, Gangchun Xu, Zhijuan Nie, Pao Xu, and Ruobo Gu. 2014. "Transcriptome Analysis Gene Expression in the Liver of *Coilia Nasus* during the Stress Response." *BMC Genomics* 15 (1): 558. doi:10.1186/1471-2164-15-558.
- Fernandez de la Reguera, Catalina. 2013. "Estudio de La Participación Del Complejo Nucleolar eNoSC En La Regulación Epigenética Durante El Proceso de Aclimatización Del Pez *Cyprinus Carpio* . Estudio de La Participación Del Complejo Nucleolar eNoSC En La Regulación Epigenética Durante El Proceso D." *Tesis Para Optar Al Grado de Magister En Bioquímica*.
- Fuentes, Eduardo N., Rodrigo Zuloaga, Gino Nardocci, Catalina Fernandez de la Reguera, Nicolas Simonet, Robinson Fumeron, Juan Antonio Valdes, Alfredo Molina, and Marco Alvarez. 2014. "Skeletal Muscle Plasticity Induced by Seasonal Acclimatization in Carp Involves Differential Expression of rRNA and Molecules That Epigenetically Regulate Its Synthesis." *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology* 172–173 (1). Elsevier Inc.: 57–66. doi:10.1016/j.cbpb.2014.04.005.
- Garcia, Jose, Eann S. Munro, Milena M. Monte, Mickael C S Fourrier, Jason Whitelaw, David A. Smail, and Anthony E. Ellis. 2010. "Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Serum Vitellogenin Neutralises Infectivity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus

- (IPNV).” *Fish and Shellfish Immunology* 29 (2). Elsevier Ltd: 293–97. doi:10.1016/j.fsi.2010.04.010.
- Glisic, Branka, Ivan Mihaljevic, Marta Popovic, Roko Zaja, Jovica Loncar, Karl Fent, Radmila Kovacevic, and Tvrtko Smital. 2015. “Characterization of Glutathione-S-Transferases in Zebrafish (Danio Rerio).” *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 158 (January): 50–62. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.013.
- Gracey, Andrew Y, E Jane Fraser, Weizhong Li, Yongxiang Fang, Ruth R Taylor, Jane Rogers, Andrew Brass, and Andrew R Cossins. 2004. “Coping with Cold: An Integrative, Multitissue Analysis of the Transcriptome of a Poikilothermic Vertebrate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (48): 16970–75. doi:10.1073/pnas.0403627101.
- Haas, Brian J, Alexie Papanicolaou, Moran Yassour, Manfred Grabherr, Philip D Blood, Joshua Bowden, Matthew Brian Couger, et al. 2013. “De Novo Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis.” *Nature Protocols* 8 (8): 1494–1512. doi:10.1038/nprot.2013.084.
- Haas, Brian J, Alexie Papanicolaou, Moran Yassour, Manfred Grabherr, D Philip, Joshua Bowden, Matthew Brian Couger, et al. 2014. *Reference Generation and Analysis with Trinity*. *Nat Protocols*. Vol. 8. doi:10.1038/nprot.2013.084.De.
- Hatem, Elie, Vronique Berthoud, Michle Dardalhon, Gilles Lagniel, Peggy Baudouin-Cornu, Meng-Er Huang, Jean Labarre, and Stphane Chdin. 2014. “Glutathione Is Essential to Preserve Nuclear Function and Cell Survival under Oxidative Stress.” *Free Radical Biology & Medicine* 75 Suppl 1 (October): S25–6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.746.
- Hazel, J R, and E E Williams. 1990. “The Role of Alterations in Membrane Lipid Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to Their Physical Environment.” *Progress in Lipid Research* 29 (3): 167–227. doi:10.1016/0163-7827(90)90002-3.
- He, Xia, Yuhuang Li, Mu-Shui Dai, Xiao-Xin Sun, Xia He, Yuhuang Li, Mu-Shui Dai, and Xiao-Xin Sun. 2016. “Ribosomal Protein L4 Is a Novel Regulator of the MDM2-p53 Loop.” *Oncotarget* 7 (13): 16217–26. doi:10.18632/oncotarget.7479.
- Im, Jisu, Gibeom Kwon, Dongsoo Kong, and Sungho Ghil. 2016. “Identification of a

- Warm-Temperature Acclimation-Associated 65-kDa Protein Encoded by a Temperature- and Infection-Responsive Gene in the Kumgang Fat Minnow *Rhynchocypris Kumgangensis*.” *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 325 (1): 65–74. doi:10.1002/jez.1997.
- Inostroza, Juan, Maria Ines Vera, Oscar Goicoechea, Rodolfo Amthauer, and Manuel Krauskopf. 1990. “Apolipoprotein A??I Synthesis during the Acclimatization of the Carp (*Cyprinus Carpio*).” *Journal of Experimental Zoology* 256 (1): 8–15. doi:10.1002/jez.1402560103.
- Johnson, Elizabeth O, Themis C Kamilaris, George P Chrousos, and Philip W Gold. 1992. “Mechanisms of Stress: A Dynamic Overview of Hormonal and Behavioral Homeostasis.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 16 (2): 115–30. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80175-7.
- Jung, Won Yong, Sang Sook Lee, Chul Wook Kim, Hyun-Soon Kim, Sung Ran Min, Jae Sun Moon, Suk-Yoon Kwon, Jae-Heung Jeon, and Hye Sun Cho. 2014. “RNA-Seq Analysis and de Novo Transcriptome Assembly of Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus* Linne).” *PloS One* 9 (11): e111982. doi:10.1371/journal.pone.0111982.
- Kawaguchi, H, C C Pilbeam, J R Harrison, and L G Raisz. 1995. “The Role of Prostaglandins in the Regulation of Bone Metabolism.” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 313. Elsevier Ltd: 36–46. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.022.
- Kikuchi, K., M. Yamashita, S. Watabe, and K. Aida. 1995. “The Warm Temperature Acclimation-Related 65-kDa Protein, Wap65, in Goldfish and Its Gene Expression.” *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.270.29.17087.
- Kure, Elin H., Mona Sæbø, Astrid M. Stangeland, Julian Hamfjord, Sigurd Hytterød, Jan Heggenes, and Espen Lydersen. 2013. “Molecular Responses to Toxicological Stressors: Profiling microRNAs in Wild Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Exposed to Acidic Aluminum-Rich Water.” *Aquatic Toxicology* 138–139. Elsevier B.V.: 98–104. doi:10.1016/j.aquatox.2013.04.004.
- Li, Chao, Yu Zhang, Ruijia Wang, Jianguo Lu, Samiran Nandi, Sriprakash Mohanty, Jeffery Terhune, Zhanjiang Liu, and Eric Peatman. 2012. “RNA-Seq Analysis of Mucosal Immune Responses Reveals Signatures of Intestinal Barrier Disruption and Pathogen Entry Following *Edwardsiella ictaluri* Infection in Channel Catfish, *Ictalurus*

- Punctatus.” *Fish & Shellfish Immunology* 32 (5): 816–27. doi:10.1016/j.fsi.2012.02.004.
- Liang, LiQun, YuMei Chang, XuLing He, and Ran Tang. 2015. “Transcriptome Analysis to Identify Cold-Responsive Genes in Amur Carp (*Cyprinus Carpio Haematopterus*).” *Plos One* 10 (6): e0130526. doi:10.1371/journal.pone.0130526.
- Liu, Min, Junli Pan, Hongfang Ji, Bosheng Zhao, and Shicui Zhang. 2011. “Vitellogenin Mediates Phagocytosis through Interaction with Fc??R.” *Molecular Immunology* 49 (1–2). Elsevier Ltd: 211–18. doi:10.1016/j.molimm.2011.08.011.
- Liu, Sixin, Guangtu Gao, Yniv Palti, Beth M. Cleveland, Gregory M. Weber, and Caird E. Rexroad. 2014. “RNA-Seq Analysis of Early Hepatic Response to Handling and Confinement Stress in Rainbow Trout.” *PLoS ONE* 9 (2): 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0088492.
- Lodish, HF, and A Berk. 2008. “Molecular Cell Biology.” *Perspective*. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Molecular+Cell+Bi+ology#0>.
- Mininni, Alba N, Massimo Milan, Serena Ferraresso, Tommaso Petochi, Patrizia Di Marco, Giovanna Marino, Silvia Livi, Chiara Romualdi, Luca Bargelloni, and Tomaso Patarnello. 2014. “Liver Transcriptome Analysis in Gilthead Sea Bream upon Exposure to Low Temperature.” *BMC Genomics* 15 (1): 765. doi:10.1186/1471-2164-15-765.
- Moyes, Christopher D., and Patricia M. Schulte. 2007. *Principios de Fisiología Animal*. Madrid : Pearson Educación. http://cataleg.ub.edu/record=b1787189~S1*cat.
- Nardocci, Gino. 2012. “Epigenetic Regulation of *Cyprinus Carpio* Ribosomal Cistron during the Acclimatization Process ‘ ’ Epigenetic Regulation of *Cyprinus Carpio* Ribosomal Cistron during the Acclimatization Process.” *Tesis Para Optar Al Grado de Doctor En Biociencias Moleculares*.
- Pankhurst, N. W., G. J. Purser, G. Van Der Kraak, P. M. Thomas, and G. N R Forteach. 1996. “Effect of Holding Temperature on Ovulation, Egg Fertility, Plasma Levels of Reproductive Hormones and in Vitro Ovarian Steroidogenesis in the Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*.” *Aquaculture* 146 (3–4): 277–90. doi:10.1016/S0044-8486(96)01374-9.

- Pfaffl, M W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Pierre, S., K. Tarnowska, L. Hachfi, S. Coupé, R. Simide, S. Couvray, C. Garnier, et al. 2011. "EFFECTS OF WATER TEMPERATURE INCREASE AND HEAVY METALS CONTAMINATION ON WAP65 GENE EXPRESSION IN SEA BASS (*Dicentrarchus Labrax*) LIVER." *Cell. Mol. Biol.* 57 (June): 1614–22. doi:10.1170/187.
- Qian, Xi, Yi Ba, Qianfeng Zhuang, and Guofang Zhong. 2014. "RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 18 (2): 98–110. doi:10.1089/omi.2013.0110.
- Quezada, Claudia, Cristina Navarro, Rody San Martín, Marco Álvarez, Alfredo Molina, and M. Inés Vera. 2006. "Genomic Organization of Nucleolin Gene in Carp Fish: Evidence for Several Genes." *Biological Research* 39 (2): 353–65. doi:S0716-97602006000200017.
- Robertson, Cayleih E, Patricia A Wright, Louise Köblitz, and Nicholas J Bernier. 2014. "Hypoxia-Inducible Factor-1 Mediates Adaptive Developmental Plasticity of Hypoxia Tolerance in Zebrafish, *Danio Rerio*." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 281 (1786). doi:10.1098/rspb.2014.0637.
- Robinson, Mark D, and Alicia Oshlack. 2010. "A Scaling Normalization Method for Differential Expression Analysis of RNA-Seq Data." *Genome Biology* 11 (3): R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25.
- Sáez, Lino, Rodolfo Amthauer, Esteban Rodríguez, and Manuel Krauskopf. 1984. "Effects of Insulin on the Fine Structure of Hepatocytes from Winter-Acclimatized Carps: Studies on Protein Synthesis." *Journal of Experimental Zoology* 230 (2). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 187–97. doi:10.1002/jez.1402300204.
- Sarropoulou, E., J. Galindo-Villegas, A. García-Alcázar, P. Kasapidis, and V. Mulero. 2012. "Characterization of European Sea Bass Transcripts by RNA SEQ After Oral Vaccine Against *V. Anguillarum*." *Marine Biotechnology* 14 (5): 634–42. doi:10.1007/s10126-012-9466-z.
- Schulte, P. M. 2014. "What Is Environmental Stress? Insights from Fish Living in a Variable Environment." *Journal of Experimental Biology* 217 (1): 23–34.

doi:10.1242/jeb.089722.

- SIBLY, R M, and P CALOW. 1989. "A Life-Cycle Theory of Responses to Stress." *Biological Journal of the Linnean Society* 37 (1–2). Blackwell Publishing Ltd: 101–16. doi:10.1111/j.1095-8312.1989.tb02007.x.
- Simmons, Daniel L, Regina M Botting, and Timothy Hla. 2004. "Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition." *Pharmacological Reviews* 56 (3): 387–437. doi:10.1124/pr.56.3.3.
- Simonet, Nicolas Guillermo, Mauricio Reyes, Gino Nardocci, Alfredo Molina, and Marco Alvarez. 2013. "Epigenetic Regulation of the Ribosomal Cistron Seasonally Modulates Enrichment of H2A.Z and H2A.Zub in Response to Different Environmental Inputs in Carp (Cyprinus Carpio)." *Epigenetics & Chromatin* 6 (1). Epigenetics & Chromatin: 22. doi:10.1186/1756-8935-6-22.
- Smith, Steve, Louis Bernatchez, and LB Beheregaray. 2013. "RNA-Seq Analysis Reveals Extensive Transcriptional Plasticity to Temperature Stress in a Freshwater Fish Species." *BMC Genomics* 14 (1): 375. doi:10.1186/1471-2164-14-375.
- Sun, Fanyue, Eric Peatman, Chao Li, Shikai Liu, Yanliang Jiang, Zunchun Zhou, and Zhanjiang Liu. 2012. "Transcriptomic Signatures of Attachment, NF-κB Suppression and IFN Stimulation in the Catfish Gill Following Columnaris Bacterial Infection." *Developmental & Comparative Immunology* 38 (1). Elsevier Ltd: 169–80. doi:10.1016/j.dci.2012.05.006.
- Tang, Yiting, Kai Xiong, Ming Shen, Yulian Mu, Kui Li, and Honglin Liu. 2015. "CCAAT-Enhancer Binding Protein (C/EBP) β Regulates Insulin-like Growth Factor (IGF) 1 Expression in Porcine Liver during Prenatal and Postnatal Development." *Molecular and Cellular Biochemistry* 401 (1–2). Springer US: 209–18. doi:10.1007/s11010-014-2308-8.
- Tong, Zhou, Lei Li, Ravindra Pawar, and Shicui Zhang. 2010. "Vitellogenin Is an Acute Phase Protein with Bacterial-Binding and Inhibiting Activities." *Immunobiology* 215 (11). Elsevier: 898–902. doi:10.1016/j.imbio.2009.10.001.
- Vera, María Inés, Hernán M Ríos, Erwin de la Fuente, Jaime Figueroa, and Manuel Krauskopf. 1997. "Seasonal Acclimatization of the Carp Involves Differential Expression of 5.8S Ribosomal RNA in Pituitary Cells." *Comparative Biochemistry*

- and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118 (4): 777–81. doi:10.1016/S0305-0491(97)00271-X.
- Vesterlund, Liselotte, Hong Jiao, Per Unneberg, Outi Hovatta, and Juha Kere. 2011. “The Zebrafish Transcriptome during Early Development.” *BMC Developmental Biology* 11 (1): 30. doi:10.1186/1471-213X-11-30.
- Wang, Hsiao-Lin V., and Julia A. Chekanova. 2016. “Small RNAs: Essential Regulators of Gene Expression and Defenses against Environmental Stresses in Plants.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 7 (June): n/a-n/a. doi:10.1002/wrna.1340.
- Whitehead, a., J. L. Roach, S. Zhang, and F. Galvez. 2012. “Salinity- and Population-Dependent Genome Regulatory Response during Osmotic Acclimation in the Killifish (*Fundulus Heteroclitus*) Gill.” *Journal of Experimental Biology* 215 (8): 1293–1305. doi:10.1242/jeb.062075.
- Yang, Dahai, Qin Liu, Minjun Yang, Haizhen Wu, Qiyao Wang, Jingfan Xiao, and Yuanxing Zhang. 2012. “RNA-Seq Liver Transcriptome Analysis Reveals an Activated MHC-I Pathway and an Inhibited MHC-II Pathway at the Early Stage of Vaccine Immunization in Zebrafish.” *BMC Genomics* 13 (1). ??? 319. doi:10.1186/1471-2164-13-319.
- Yang, Shuangshuang, Shousheng Liu, Baozhen Qu, Yuan Dong, and Shicui Zhang. 2016. “Identification of Sea Bass pIgR Shows Its Interaction with Vitellogenin Inducing Antibody-like Activities in HEK 293T Cells.” *Fish & Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.fsi.2016.12.001.
- Ye, Jia, Lin Fang, Hongkun Zheng, Yong Zhang, Jie Chen, Zengjin Zhang, Jing Wang, et al. 2006. “WEGO: A Web Tool for Plotting GO Annotations.” *Nucleic Acids Research* 34 (WEB. SERV. ISS.): 293–97. doi:10.1093/nar/gkl031.
- Zhai, Weiguo, and Lucio Comai. 2000. “Repression of RNA Polymerase I Transcription by the Tumor Suppressor p53.” *Molecular and Cellular Biology* 20 (16): 5930–38. doi:10.1128/MCB.20.16.5930-5938.2000.Updated.
- Zhang, Peng, Qing Yao, Ling Lu, Yun Li, Po Ju Chen, and Cunming Duan. 2014. “Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia.” *Cell Reports* 6 (6). The Authors: 1110–21. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.011.

6 ANEXOS

6.1 Lista de genes sobre-expresados bioinformáticamente con software edgeR en hígado de carpa durante el invierno.

Parámetros: Tasa de cambio proporcional > 2; FDR p value < 0,001

Trinity ID	Anotacion	Fold Change
TR33002 c0_g3_i3	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma	-8,020850455
TR31798 c0_g61_i1	60s ribosomal protein l4	-8,083729124
TR19510 c0_g2_i2	acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	-7,625760469
TR30763 c2_g1_i7	acyl- :lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	-9,837510851
TR39323 c0_g4_i1	ahsg protein	-9,725501683
TR32500 c1_g2_i1	alanine aminotransferase 2-like	-4,583412641
TR30226 c2_g1_i12	alpha 8 like 2	-2,308727025
TR33399 c0_g4_i4	amino-terminal enhancer of split isoform x1	-7,82314154
TR34824 c4_g5_i9	annexin a6	-7,820598708
TR34824 c4_g5_i8	annexin a6 isoform x1	-8,452089833
TR26510 c0_g1_i1	apolipoprotein e-like	-3,037353891
TR35138 c1_g8_i1	at-rich interactive domain-containing protein 4a isoform x1	-9,065837484
TR9919 c0_g1_i3	ataxin-2-like protein isoform x3	-7,767050844
TR34167 c0_g1_i3	atp-binding cassette sub-family f member 1 isoform x1	-8,660801044
TR34645 c1_g1_i9	bone morphogenetic protein receptor type-2	-8,849766041
TR2853 c0_g1_i1	brain protein 44-like protein	-7,714604163
TR30159 c1_g11_i8	branched-chain-amino-acid cytosolic	-5,875479657
TR28912 c0_g4_i3	calcipressin-1 isoform x2	-7,808235587
TR34838 c0_g2_i3	carnitine o-palmitoyltransferase liver isoform-like isoform x1	-8,767799131
TR33484 c0_g1_i4	catenin beta-1 isoform x1	-7,957493638
TR34579 c5_g43_i2	cathepsin e-like	-4,471071206
TR30107 c3_g6_i3	claudin 15-like b precursor	-8,023087453
TR5858 c0_g1_i1	cocaine- and amphetamine-regulated transcript	-4,266318517
TR34862 c15_g42_i3	cold inducible rna binding protein	-4,206480371
TR33760 c1_g16_i9	cryptochrome 2a	-7,759529716
TR31233 c0_g2_i1	cyclic amp-dependent transcription factor atf-1-like isoform x1	-6,161241181
TR33987 c0_g1_i4	cyclic amp-dependent transcription factor atf-6 alpha	-8,776954782
TR88818 c0_g2_i1	cystatin precursor	-10,61406455
TR33661 c2_g1_i1	cysteine dioxygenase type 1	-7,730524074

TR15344 c0_g2_i2	cystine glutamate transporter	-5,207913324
TR21520 c0_g1_i1	cytochrome c oxidase polypeptide viii- mitochondrial precursor	-3,047923549
TR32108 c0_g1_i1	cytoplasmic protein nck1 isoform x1	-8,127928458
TR25925 c0_g1_i2	d-3-phosphoglycerate dehydrogenase	-4,388530378
TR35241 c4_g2_i12	denn domain-containing protein 5b isoform x1	-8,273210886
TR35241 c4_g2_i7	denn domain-containing protein 5b isoform x1	-8,240633396
TR10167 c4_g1_i1	dihydroxyacetone phosphate acyltransferase isoform x3	-8,016345907
TR34786 c0_g2_i6	dna repair protein rev1	-7,642751464
TR35170 c2_g1_i1	e3 ubiquitin isg15 ligase trim25-like isoform x3	-8,632911671
TR35205 c1_g1_i1	e3 ubiquitin-protein ligase trip12 isoform x1	-9,174417516
TR24319 c0_g1_i2	elongation factor 2	-2,503840859
TR68723 c0_g2_i1	epidermal retinol dehydrogenase 2	-9,744768944
TR11749 c0_g1_i1	estrogen receptor alpha	-7,850373008
TR30353 c7_g7_i1	ethanolamine-phosphate phospho-lyase	-8,850868268
TR34073 c0_g3_i8	ferm domain-containing protein 4b-like isoform x2	-7,098460335
TR33650 c0_g1_i2	fibroblast growth factor receptor-like 1	-7,690216726
TR24315 c0_g1_i1	fk506-binding protein 11 precursor	-2,477075993
TR32825 c2_g16_i2	g-protein coupled receptor 4-like	-8,345195659
TR29861 c0_g1_i1	glucokinase	-3,44841818
TR25704 c0_g1_i1	glutamate receptor 2 isoform x1	-3,475292252
TR33961 c0_g1_i4	glycerol-3-phosphate acyltransferase mitochondrial	-8,262299039
TR25110 c0_g1_i2	gsk3-beta interaction protein	-8,003445384
TR8570 c0_g2_i1	heat shock cognate 71 kda	-8,787504096
TR32289 c7_g1_i3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1	-8,321165397
TR27092 c3_g1_i1	hexokinase hkdc1	-4,235422115
TR35041 c1_g1_i4	histone-lysine n-methyltransferase ehmt1 isoform x4	-7,740865103
TR34321 c0_g1_i4	kinectin isoform x2	-8,695242015
TR34321 c0_g1_i8	kinectin isoform x3	-8,260580717
TR35024 c0_g2_i5	leucine--trna cytoplasmic	-9,342516435
TR14325 c0_g1_i1	lipocalin precursor	-8,233778949
TR25080 c0_g3_i1	liver-expressed antimicrobial peptide 2-like	-5,376658417
TR35325 c1_g2_i3	low quality protein: type iii iodothyronine deiodinase-like	-8,599285527
TR30947 c3_g1_i2	methylenetetrahydrofolate reductase	-4,237430179
TR19720 c0_g3_i1	mhc class i antigen	-10,32865772
TR52674 c0_g4_i1	mhc class i partial	-8,643108996
TR22981 c0_g1_i1	mhc class ii alpha chain	-10,52691219
TR93783 c0_g1_i1	mhc class ii antigen	-8,53640323
TR3424 c0_g2_i3	mhc class ii beta partial	-11,18924775
TR67298 c0_g2_i1	microsomal glutathione s-transferase 1	-2,571594113

TR29922 c0_g1_i3	microtubule-associated protein rp eb family member 3-like isoform x2	-4,727199364
TR28276 c1_g1_i1	middle subunit-like	-7,011226985
TR32386 c1_g1_i2	mitochondrial inner membrane protein	-7,828196847
TR28943 c2_g1_i1	monocarboxylate transporter 13-like isoform x2	-8,840872507
TR33068 c0_g3_i5	multifunctional protein ade2	-8,196706095
TR34921 c4_g6_i8	muscleblind-like protein 1 isoform x5	-7,808235613
TR2460 c0_g2_i1	myotrophin	-7,659720973
TR34776 c6_g2_i9	myotubularin-related protein 12	-7,746771387
TR34841 c1_g3_i5	nesprin-1 isoform x5	-9,368632031
TR34986 c0_g1_i3	nktr protein	-7,815980242
TR30431 c2_g2_i2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2	-3,659594441
TR32011 c0_g1_i1	nuclear factor interleukin-3-regulated	-8,173219515
TR33662 c2_g1_i4	oxysterol-binding protein 2	-7,8899652
TR25075 c0_g1_i4	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase b	-2,12489275
TR19316 c0_g4_i1	phosphoethanolamine n-methyltransferase 3-like isoform x1	-8,199709663
TR5786 c0_g1_i1	phosphoserine phosphatase isoform x2	-3,837943921
TR91176 c0_g1_i1	plasma retinol-binding protein 1	-2,368713025
TR28967 c1_g1_i1	pol protein	-3,063703158
TR33232 c0_g2_i3	poly(adp-ribose) glycohydrolase	-7,820598635
TR32272 c1_g2_i1	potassium channel subfamily k member 6	-8,492196167
TR34423 c1_g1_i4	pre-mrna cleavage complex 2 protein partial	-7,905211562
TR32601 c0_g2_i4	probable global transcription activator snf2l2	-9,67478841
TR32245 c0_g2_i1	prospero homeobox protein 1-like isoform x2	-8,817285935
TR35111 c0_g6_i2	protein capicua homolog isoform x2	-7,978941726
TR33239 c1_g1_i7	protein furry homolog isoform x3	-9,231500072
TR34896 c1_g2_i3	protein groucho-1 isoform x1	-9,062276361
TR35228 c1_g1_i5	protein strawberry notch homolog 1 isoform x1	-8,093135977
TR33356 c2_g22_i4	protein transport protein sec61 subunit alpha-like 1	-2,9725948
TR21681 c0_g1_i1	purine nucleoside phosphorylase-like	-2,579609517
TR34026 c0_g2_i24	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 2	-8,770349894
TR34008 c0_g2_i3	receptor tyrosine-protein kinase erbb-3	-8,120518152
TR34655 c1_g3_i1	receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	-8,248460344
TR34830 c0_g1_i5	regulatory-associated protein of mtor isoform x1	-7,74677144
TR26511 c1_g23_i1	retinol binding protein 4	-8,014073196
TR31798 c0_g3_i1	ribosomal protein l4	-5,62162136
TR31798 c0_g16_i1	ribosomal protein partial	-3,531414142
TR30252 c0_g1_i5	ring finger protein 122-like	-7,878892692
TR33508 c1_g1_i3	rpe-retinal g protein-coupled receptor-like	-7,958687686
TR33356 c2_g11_i1	sec61 alpha like 1	-3,526318488

TR34942 c4_g4_i5	semaphorin-4g	-9,054880178
TR33257 c0_g1_i4	serine threonine-protein kinase plk2	-5,608427689
TR33313 c0_g2_i1	sestrin-1 isoform x2	-8,02400205
TR26012 c1_g3_i4	solute carrier family 25 member 38-b	-7,62002206
TR34327 c0_g1_i8	sorting nexin-1	-7,738110993
TR33793 c0_g1_i4	star-related lipid transfer protein 13-like isoform x1	-8,55255743
TR30633 c0_g1_i2	stress-70 mitochondrial	-8,783292756
TR32365 c3_g1_i10	sugar phosphate exchanger 3	-7,873761958
TR34326 c0_g1_i1	sun domain-containing protein 1	-8,456336661
TR30686 c0_g1_i2	thioredoxin domain-containing protein 5	-3,05889002
TR34453 c2_g4_i7	translation initiation factor eif-2b subunit epsilon	-7,832613293
TR32162 c1_g1_i6	transmembrane protein 150a-like	-5,707723663
TR29682 c0_g1_i2	transmembrane protein 56-b-like	-8,252485683
TR11266 c0_g2_i1	trna-splicing ligase homolog	-8,323967883
TR30226 c2_g1_i9	tubulin alpha chain-like	-2,229592668
TR35020 c0_g1_i3	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 32 isoform x2	-7,662559412
TR33979 c0_g1_i4	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 isoform x2	-8,11821589
TR33976 c0_g5_i4	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase cyld-like	-7,956355267
TR32908 c11_g4_i5	udp glucuronosyltransferase 1 family b	-2,949770136
TR34890 c1_g2_i12	unconventional myosin-ixb-like isoform x2	-10,21867147
TR27230 c0_g3_i1	unnamed protein product	-8,105433919
TR27196 c3_g3_i5	uridine phosphorylase 2	-2,799196825
TR25455 c0_g1_i4	vitellogenin 1 precursor	-4,617636956
TR22498 c0_g3_i1	vitellogenin 3	-8,105433917
TR64973 c0_g1_i1	vitellogenin 5	-10,36507774
TR3273 c18_g1_i1	vitellogenin b1	-16,15391986
TR35042 c28_g1_i1	vitellogenin b1	-14,84421159
TR14965 c0_g1_i1	vitellogenin b2	-11,33162836
TR14391 c0_g2_i1	vitellogenin c	-13,19150313
TR34517 c2_g4_i3	xanthine dehydrogenase oxidase	-8,924336853
TR32305 c1_g1_i1	xin actin-binding repeat-containing protein 2-like	-9,211310611
TR33833 c0_g1_i10	yeats domain-containing protein 2 isoform x1	-7,852858818
TR70093 c0_g1_i1	zgc:136383 protein	-10,65254127
TR28958 c3_g1_i4	zgc:55605 protein	-8,941023973

6. 2 Lista de genes sobre-expresados bioinformáticamente con software edgeR en hígado de carpa durante el verano

Parámetros: Tasa de cambio proporcional > 2; FDR p value < 0,001.

Trinity ID	Anotacion	Fold Change
TR27068 c1_g1_i4	25-hydroxyvitamin d-1 alpha mitochondrial	7,754717181
TR32418 c0_g1_i3	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase	8,61455273
TR76133 c0_g1_i1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	3,725879808
TR22503 c0_g6_i1	40s ribosomal protein s28	3,006462347
TR29751 c1_g2_i2	4f2 cell-surface antigen heavy chain	2,201219368
TR17024 c0_g1_i1	5-hydroxyisourate hydrolase-like	2,564359379
TR35235 c0_g4_i6	5-phosphohydroxy-l-lysine phospho-lyase	5,935330581
TR23681 c2_g85_i1	6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase	5,769733181
TR31355 c0_g1_i1	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1	3,71751229
TR34190 c0_g2_i4	abl interactor 2 isoform x2	8,070603244
TR31720 c0_g2_i5	actin-binding lim protein 1 isoform x5	8,236112289
TR32513 c6_g21_i1	acyl- desaturase-like	3,917043664
TR24965 c0_g1_i2	adipocyte plasma membrane-associated protein	10,00618104
TR33245 c1_g4_i7	adiponectin receptor protein 2-like	8,880349703
TR24576 c16_g3_i1	ahsg protein	2,11314224
TR31783 c2_g1_i1	alcohol dehydrogenase 1-like	3,235973014
TR67281 c0_g2_i1	aldolase b fructose- partial	4,039489932
TR35283 c28_g362_i1	alpha 2-macroglobulin 4	7,825444064
TR3558 c1_g1_i2	alpha-2-hs-glyco	2,378440527
TR26930 c0_g1_i5	amine sulfotransferase-like	3,135725765
TR29517 c0_g1_i4	aminoacyl trna synthase complex-interacting multifunctional protein 2 isoform x1	3,433869344
TR88911 c4_g1_i1	apolipoprotein c-i	7,266885195
TR50528 c0_g1_i1	apolipoprotein m	2,873516936
TR29495 c1_g6_i5	band -like protein 5 isoform x1	4,674284825
TR26857 c4_g16_i2	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core	2,262658201
TR34682 c0_g2_i18	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein isoform x1	7,685089241
TR31088 c8_g20_i1	beta globin	3,758387396
TR29737 c2_g3_i2	bifunctional udp-n-acetylglucosamine 2-epimerase n-acetylmannosamine kinase isoform x4	8,856678994
TR34879 c1_g1_i8	calcium calmodulin-dependent protein kinase type ii subunit beta isoform x22	7,677720839
TR31391 c1_g6_i8	calcium-binding mitochondrial carrier protein s -2-a	8,393163219
TR31391 c1_g6_i1	calcium-binding mitochondrial carrier protein s -2-a-like	9,314099954
TR10070 c0_g2_i1	carboxymethylenebutenolidase homolog	3,695371348
TR26170 c0_g1_i3	ccat enhancer-binding protein delta	3,151084073
TR29209 c0_g2_i2	cellular myelocytomatosis partial	3,962868266
TR22421 c1_g1_i1	chymotrypsin-like elastase family member 2a	2,189984392
TR10173 c0_g1_i2	class e basic helix-loop-helix protein 40	2,813505386

TR31578 c1_g3_i7	cobl_danre ame: full=protein cordon-bleu	8,346933301
TR31973 c1_g28_i1	coenzyme q-binding protein coq10 mitochondrial-like	3,953576892
TR28274 c0_g1_i13	collagen alpha-1 chain-like	9,4439885
TR35093 c1_g2_i1	collagen type i alpha 2	3,199686103
TR50751 c0_g1_i1	complement c3	2,32203996
TR33453 c0_g1_i5	cysteine serine-rich nuclear protein 1-like	7,86789443
TR33345 c1_g7_i1	cytochrome family subfamily polypeptide 9	3,89029697
TR32318 c4_g4_i5	cytochrome p450 2j6-like	9,711882616
TR33035 c7_g1_i1	cytokine-inducible sh2-containing protein	3,337331135
TR34438 c1_g1_i10	cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4-like isoform x1	8,248113075
TR32108 c0_g1_i6	cytoplasmic protein nck1 isoform x1	7,772332877
TR34442 c27_g2_i1	cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase-like	2,745433981
TR31205 c3_g1_i5	d-amino-acid oxidase	4,047885581
TR30304 c1_g2_i1	delta-6 fatty acyl desaturase	2,096642118
TR28380 c1_g10_i2	diablo mitochondrial-like	2,464168239
TR34036 c5_g2_i9	dimethylaniline monooxygenase-like	7,973817327
TR33244 c0_g2_i1	early growth response protein 1-like	4,649883849
TR32693 c0_g2_i10	eif4ba protein	4,430551279
TR28061 c0_g3_i1	elastase-1-like isoform x1	10,27210168
TR26146 c0_g1_i1	elongation factor 1-delta isoform x5	2,570175734
TR33153 c0_g1_i1	elongation factor 2	2,92638641
TR25473 c0_g1_i8	endothelial lipase	4,689854557
TR33474 c0_g3_i6	estrogen receptor beta	7,799135679
TR30195 c0_g2_i7	eukaryotic initiation factor 4a-ii	2,99297809
TR30195 c0_g2_i3	eukaryotic initiation factor 4a-ii	6,661198761
TR26703 c0_g1_i1	eukaryotic translation initiation factor 1b	8,339529616
TR33100 c0_g1_i2	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit a isoform x1	9,668163501
TR22999 c0_g1_i1	fatty acid-binding heart	2,200395426
TR72764 c0_g1_i1	fatty acid-binding liver-like	2,910482751
TR90075 c0_g1_i1	fatty acid-binding protein 10- liver basic-like	2,57617657
TR23681 c2_g142_i1	fetuin long form	8,247406591
TR30836 c0_g2_i8	formin-like protein 2 isoform x3	8,813360623
TR93750 c0_g1_i1	fructose-bisphosphate aldolase b	3,469506293
TR31830 c1_g1_i7	fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2-like isoform x1	4,502199254
TR30354 c4_g1_i5	glucose-6-phosphatase-like	9,076646445
TR29977 c2_g3_i3	glutathione s-transferase kappa 1	7,82880829
TR3735 c0_g1_i2	glutathione s-transferase mu 3-like	2,566221148
TR33112 c1_g133_i1	glutathione s-transferase rho	8,447957164
TR32038 c1_g2_i12	glycerophosphocholine phosphodiesterase gpcpd1 isoform x2	2,936131062
TR25697 c0_g1_i1	growth arrest and dna-damage-inducible protein gadd45 beta	3,27994044
TR27842 c0_g1_i4	guanidinoacetate n-methyltransferase	2,33126327
TR21462 c0_g3_i1	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	4,286083415
TR27355 c1_g4_i3	hemoglobin alpha	3,640388408

TR32080 c17_g3_i1	hepatic lipase	3,427182236
TR32289 c7_g1_i6	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1-like	9,60900991
TR32846 c3_g1_i2	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins c1 c2 isoform x2	8,036485716
TR20896 c0_g2_i1	histone h1x	3,237706423
TR101447 c0_g1_i1	hpx protein	3,398414831
TR30140 c3_g1_i9	hydroxymethylglutaryl- cytoplasmic-like	4,605420211
TR32998 c1_g1_i11	hypoxia-inducible factor 3 alpha subunit	8,116668403
TR18665 c0_g3_i1	ictacalcin	5,521121675
TR34052 c0_g1_i1	im:7149072 protein	7,677720852
TR2629 c0_g2_i1	immediate early response gene 2 protein	3,837642988
TR26567 c2_g1_i4	inositol oxygenase	8,373115566
TR22611 c0_g4_i2	insulin-like growth factor-binding protein 1	3,54283879
TR33507 c24_g19_i1	integrin beta-1 precursor	12,12035483
TR28931 c1_g1_i6	ketoheokinase isoform x2	2,975423352
TR33333 c2_g7_i6	krueppel-like factor 15	3,504300504
TR33692 c4_g1_i5	l-threonine 3- mitochondrial-like	3,68163596
TR28924 c1_g3_i1	lanosterol synthase	5,371700569
TR9560 c0_g1_i1	lectin precursor	8,02301723
TR93180 c0_g1_i1	lipocalin-type prostaglandin d synthase-like protein	4,019479075
TR84253 c0_g1_i1	liver-expressed antimicrobial peptide 2b	4,314940754
TR32947 c3_g1_i2	lon peptidase n-terminal domain and ring finger protein 1-like	4,736068101
TR34240 c2_g2_i3	long-chain-fatty-acid-- ligase acsbg2-like	5,635953117
TR23397 c0_g1_i1	low quality protein: glutathione peroxidase 3	13,58494924
TR31783 c2_g1_i3	methionine aminopeptidase 1	2,895744017
TR3570 c2_g2_i3	mhc class i alpha chain	2,383819464
TR19720 c0_g2_i1	mhc class i antigen	7,656045972
TR30976 c2_g4_i1	mitochondrial amidoxime-reducing component 1-like	5,128303732
TR31443 c4_g4_i2	mitochondrial-like	8,965214653
TR29209 c0_g2_i1	myc proto-oncogene protein	2,896374335
TR26699 c1_g1_i1	myoglobin	2,491057238
TR27009 c0_g13_i1	nascent polypeptide-associated complex subunit muscle-specific partial	9,337707911
TR33997 c1_g3_i1	nedd4-like e3 ubiquitin-protein ligase wwp1	8,672698237
TR24693 c0_g2_i1	nuclear factor interleukin-3-regulated	4,268934731
TR25647 c1_g3_i2	nuclear protein 1-like	2,863521735
TR33022 c0_g1_i3	nuclear receptor ror-gamma isoform x1	8,006192993
TR34953 c0_g2_i8	o-linked n-acetylglucosamine transferase isoform 1	8,488071622
TR34381 c0_g4_i10	oxysterol-binding protein 9 isoform x3	7,856491345
TR30728 c1_g28_i1	pancreatic alpha-amylase	2,990899633
TR30728 c1_g54_i3	pancreatic alpha-amylase-like	2,356385149
TR32864 c0_g1_i1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkbp5-like	3,210647611
TR26622 c0_g2_i2	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkbp8	8,013877292
TR3737 c0_g2_i1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase partial	7,681406956
TR34801 c0_g4_i2	period 1	8,775313291

TR35047 c1_g1_i8	period circadian protein homolog 2	9,201797203
TR26587 c0_g1_i1	phytanoyl- dioxygenase domain-containing protein 1	4,208305278
TR50733 c0_g1_i1	pigment epithelium-derived factor	2,229090597
TR3634 c0_g1_i3	plasmolipin	7,954578877
TR26762 c0_g2_i3	potassium voltage-gated channel subfamily a member 2	8,61304476
TR34341 c0_g2_i4	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101882769	8,540701626
TR10622 c1_g1_i1	probable imidazolonepropionase	2,23350716
TR26138 c1_g1_i1	protein btg2	3,619601736
TR31796 c2_g12_i6	protein phosphatase ptc7 homolog	7,954578935
TR32131 c1_g1_i1	protein tob1-like	2,785481423
TR10018 c1_g1_i4	purine nucleoside phosphorylase-like	3,426914309
TR29851 c0_g1_i6	pyruvate dehydrogenase e1 component subunit mitochondrial-like isoform x2	8,199244188
TR31378 c2_g4_i3	pyruvate dehydrogenase isozyme 4	4,305373712
TR34585 c0_g1_i1	rap guanine nucleotide exchange factor 1-like isoform x3	7,904782101
TR33768 c2_g6_i7	ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1 isoform x1	8,159559772
TR34175 c8_g4_i4	retinoic acid receptor responder protein 3	7,734356254
TR30717 c0_g2_i3	rho gdp-dissociation inhibitor 1	9,593400623
TR31798 c0_g58_i1	ribosomal protein l4	3,301393258
TR26567 c3_g1_i2	ring finger protein 207	4,064785768
TR33535 c1_g1_i2	rna-binding protein 39 isoform x2	8,866397478
TR33311 c0_g2_i5	rna-binding protein 5	8,604125402
TR35071 c2_g2_i8	semaphorin-4g- partial	8,882029543
TR34087 c2_g10_i2	septin-7-like isoform x2	7,819970051
TR32270 c1_g1_i12	serine arginine-rich splicing factor 5-like	3,176320654
TR29231 c8_g21_i2	serine--pyruvate aminotransferase-like	8,349424574
TR14912 c0_g1_i1	sex hormone-binding globulin	3,658086632
TR21418 c0_g1_i2	solute carrier family 25 member 33	2,600753032
TR34529 c0_g7_i8	solute carrier family 41 member 1	8,141927889
TR34339 c0_g2_i2	sulfotransferase 1c1	2,438075848
TR27955 c1_g1_i1	suppressor of cytokine signaling 3	3,576812089
TR31330 c1_g2_i5	testosterone 17-beta-dehydrogenase 3 isoform x2	4,796795677
TR29025 c0_g1_i4	torsin-3a	2,829063219
TR28963 c0_g1_i2	transcription factor jun-b-like	3,339158884
TR30701 c25_g2_i1	transferrin variant 4	2,850656178
TR23461 c0_g3_i1	transferrin variant c	4,09677718
TR27995 c0_g7_i1	translocon-associated protein subunit gamma	4,409966009
TR29045 c0_g1_i2	transmembrane protein 161a	8,020834901
TR22346 c0_g2_i1	transmembrane protein 238-like	2,778514449
TR2236 c0_g2_i1	transmembrane protein 43	7,737920843
TR30301 c5_g1_i1	tristetraprolin-like	3,111898456
TR32330 c0_g1_i13	trna selenocysteine 1-associated protein 1-like	9,466784879
TR50409 c0_g1_i1	try protein	2,227670017
TR67280 c0_g1_i1	trypsin 1	7,681406948

TR30716 c9_g86_i1	trypsinogen 1a	2,049415434
TR9196 c0_g2_i1	trypsinogen precursor	8,322700842
TR34067 c0_g2_i1	type alpha 3	3,478721276
TR28930 c0_g2_i3	type i cytoskeletal 13-like	3,933316114
TR33958 c5_g4_i3	tyrosine aminotransferase	2,804485455
TR27171 c0_g2_i1	uncharacterized oxidoreductase -like	2,623403017
TR27196 c3_g3_i7	uridine phosphorylase 2	3,325461464
TR10622 c0_g1_i1	utp--glucose-1-phosphate uridylyltransferase-like isoform x1	2,092004911
TR13330 c0_g3_i1	vitamin d-binding protein	3,046907573
TR40163 c0_g1_i1	vitamin d-binding protein precursor	7,785305023
TR22423 c0_g1_i1	xylulose kinase	2,886039954
TR30354 c6_g29_i1	zgc:92753 protein	3,059414202
TR29298 c0_g7_i6	zinc finger protein 618 isoform x1	8,423213031
TR35307 c0_g1_i1	warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein	5,109712437

6.1 Vías metabólicas sobre-reguladas en verano. Anotación según vías KEGG (KO de referencia) utilizando software Blast2GO y KEGG mapper.

ko01100 Metabolic pathways (90)
ko01110 Biosynthesis of secondary metabolites (44)
ko01120 Microbial metabolism in diverse environments (32)
ko01130 Biosynthesis of antibiotics (25)
ko00010 Glycolysis / Gluconeogenesis (22)
ko01200 Carbon metabolism (18)
ko00561 Glycerolipid metabolism (16)
ko00071 Fatty acid degradation (12)
ko00230 Purine metabolism (11)
ko00260 Glycine, serine and threonine metabolism (11)
ko00350 Tyrosine metabolism (11)
ko01230 Biosynthesis of amino acids (11)
ko00620 Pyruvate metabolism (11)
ko00590 Arachidonic acid metabolism (10)
ko00982 Drug metabolism - cytochrome P450 (9)
ko00680 Methane metabolism (9)
ko00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (8)
ko00592 alpha-Linolenic acid metabolism (8)
ko04010 MAPK signaling pathway (8)
ko00591 Linoleic acid metabolism (7)
ko00565 Ether lipid metabolism (7)
ko00625 Chloroalkane and chloroalkene degradation (7)
ko00564 Glycerophospholipid metabolism (7)
ko00670 One carbon pool by folate (6)
ko00100 Steroid biosynthesis (6)
ko00830 Retinol metabolism (6)
ko05204 Chemical carcinogenesis (6)
ko04975 Fat digestion and absorption (6)
ko00020 Citrate cycle (TCA cycle) (6)
ko00030 Pentose phosphate pathway (6)
ko00051 Fructose and mannose metabolism (6)
ko00140 Steroid hormone biosynthesis (5)
ko00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes (5)
ko01220 Degradation of aromatic compounds (5)
ko00330 Arginine and proline metabolism (5)
ko04972 Pancreatic secretion (5)
ko00626 Naphthalene degradation (5)
ko00380 Tryptophan metabolism (4)
ko00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms (4)
ko04922 Glucagon signaling pathway (4)
ko04270 Vascular smooth muscle contraction (4)
ko00480 Glutathione metabolism (4)
ko04014 Ras signaling pathway (4)
ko00280 Valine, leucine and isoleucine degradation (4)
ko00410 beta-Alanine metabolism (4)
ko03015 mRNA surveillance pathway (3)
ko04113 Meiosis - yeast (3)

ko04152 AMPK signaling pathway (3)
ko00900 Terpenoid backbone biosynthesis (3)
ko04728 Dopaminergic synapse (3)
ko04750 Inflammatory mediator regulation of TRP channels (3)
ko03320 PPAR signaling pathway (3)
ko04921 Oxytocin signaling pathway (3)
ko04913 Ovarian steroidogenesis (3)
ko00500 Starch and sucrose metabolism (3)
ko00310 Lysine degradation (3)
ko04114 Oocyte meiosis (3)
ko00340 Histidine metabolism (3)
ko04151 PI3K-Akt signaling pathway (3)
ko00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism (3)
ko00240 Pyrimidine metabolism (3)
ko04146 Peroxisome (3)
ko00053 Ascorbate and aldarate metabolism (3)
ko05230 Central carbon metabolism in cancer (3)
ko04931 Insulin resistance (3)
ko04611 Platelet activation (2)
ko00790 Folate biosynthesis (2)
ko04261 Adrenergic signaling in cardiomyocytes (2)
ko04530 Tight junction (2)
ko04115 p53 signaling pathway (2)
ko00983 Drug metabolism - other enzymes (2)
ko04066 HIF-1 signaling pathway (2)
ko00400 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (2)
ko05152 Tuberculosis (2)
ko00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism (2)
ko00940 Phenylpropanoid biosynthesis (2)
ko04720 Long-term potentiation (2)
ko00650 Butanoate metabolism (2)
ko04724 Glutamatergic synapse (2)
ko04810 Regulation of actin cytoskeleton (2)
ko00040 Pentose and glucuronate interconversions (2)
ko04022 cGMP-PKG signaling pathway (2)
ko00360 Phenylalanine metabolism (2)
ko05010 Alzheimer's disease (2)
ko04923 Regulation of lipolysis in adipocytes (2)
ko04370 VEGF signaling pathway (2)
ko04976 Bile secretion (2)
ko04730 Long-term depression (2)
ko04111 Cell cycle - yeast (2)
ko04075 Plant hormone signal transduction (2)
ko04071 Sphingolipid signaling pathway (2)
ko00120 Primary bile acid biosynthesis (2)
ko00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (2)
ko04390 Hippo signaling pathway (2)

ko05031 Amphetamine addiction (2)
ko04510 Focal adhesion (2)
ko04977 Vitamin digestion and absorption (2)
ko04970 Salivary secretion (1)
ko00730 Thiamine metabolism (1)
ko04745 Phototransduction - fly (1)
ko04650 Natural killer cell mediated cytotoxicity (1)
ko04011 MAPK signaling pathway - yeast (1)
ko00901 Indole alkaloid biosynthesis (1)
ko04020 Calcium signaling pathway (1)
ko00562 Inositol phosphate metabolism (1)
ko04350 TGF-beta signaling pathway (1)
ko04973 Carbohydrate digestion and absorption (1)
ko00130 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (1)
ko05160 Hepatitis C (1)
ko04150 mTOR signaling pathway (1)
ko00311 Penicillin and cephalosporin biosynthesis (1)
ko04924 Renin secretion (1)
ko00984 Steroid degradation (1)
ko01040 Biosynthesis of unsaturated fatty acids (1)
ko05206 MicroRNAs in cancer (1)
ko05200 Pathways in cancer (1)
ko00627 Aminobenzoate degradation (1)
ko04380 Osteoclast differentiation (1)
ko03070 Bacterial secretion system (1)
ko05222 Small cell lung cancer (1)
ko00472 D-Arginine and D-ornithine metabolism (1)
ko04391 Hippo signaling pathway - fly (1)
ko04360 Axon guidance (1)
ko05215 Prostate cancer (1)
ko04550 Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (1)
ko04726 Serotonergic synapse (1)
ko00220 Arginine biosynthesis (1)
ko00520 Amino sugar and nucleotide sugar

metabolism (1)
ko05231 Choline metabolism in cancer (1)
ko05034 Alcoholism (1)
ko04110 Cell cycle (1)
ko04664 Fc epsilon RI signaling pathway (1)
ko05218 Melanoma (1)
ko04918 Thyroid hormone synthesis (1)
ko05213 Endometrial cancer (1)
ko04660 T cell receptor signaling pathway (1)
ko04668 TNF signaling pathway (1)
ko00960 Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis (1)
ko05014 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (1)
ko00950 Isoquinoline alkaloid biosynthesis (1)
ko04210 Apoptosis (1)
ko04024 cAMP signaling pathway (1)
ko05161 Hepatitis B (1)
ko04070 Phosphatidylinositol signaling system (1)
ko05142 Chagas disease (American trypanosomiasis) (1)
ko05310 Asthma (1)
ko05168 Herpes simplex infection (1)
ko05205 Proteoglycans in cancer (1)
ko00300 Lysine biosynthesis (1)
ko00903 Limonene and pinene degradation (1)
ko05166 HTLV-I infection (1)
ko04068 FoxO signaling pathway (1)
ko04912 GnRH signaling pathway (1)
ko00072 Synthesis and degradation of ketone bodies (1)
ko01212 Fatty acid metabolism (1)
ko04925 Aldosterone synthesis and secretion (1)
ko05214 Glioma (1)
ko04662 B cell receptor signaling pathway (1)
ko04910 Insulin signaling pathway (1)
ko01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism (1)
ko04310 Wnt signaling pathway (1)

6.2 Vías metabólicas sobre-reguladas en invierno. Anotación según vías KEGG (KO de referencia) utilizando software Blast2GO y KEGG mapper

Invierno
ko01100 Metabolic pathways (114)
ko01110 Biosynthesis of secondary metabolites (45)
ko00230 Purine metabolism (34)
ko00561 Glycerolipid metabolism (30)
ko01120 Microbial metabolism in diverse environments (25)
ko00240 Pyrimidine metabolism (24)
ko01130 Biosynthesis of antibiotics (22)
ko03030 DNA replication (21)
ko00310 Lysine degradation (20)
ko00564 Glycerophospholipid metabolism (19)
ko01200 Carbon metabolism (17)
ko01230 Biosynthesis of amino acids (15)
ko03440 Homologous recombination (13)
ko03430 Mismatch repair (12)
ko00010 Glycolysis / Gluconeogenesis (10)
ko00680 Methane metabolism (10)
ko00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms (9)
ko03410 Base excision repair (8)
ko00190 Oxidative phosphorylation (8)
ko00500 Starch and sucrose metabolism (7)
ko00051 Fructose and mannose metabolism (7)
ko00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis (6)
ko04975 Fat digestion and absorption (6)
ko03420 Nucleotide excision repair (6)
ko05166 HTLV-I infection (6)
ko00030 Pentose phosphate pathway (6)
ko03460 Fanconi anemia pathway (6)
ko00600 Sphingolipid metabolism (6)
ko01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism (5)
ko04972 Pancreatic secretion (4)
ko00260 Glycine, serine and threonine metabolism (4)
ko00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (4)
ko00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism (4)
ko00220 Arginine biosynthesis (4)
ko00270 Cysteine and methionine metabolism (4)
ko00983 Drug metabolism - other enzymes (3)
ko00020 Citrate cycle (TCA cycle) (3)
ko03450 Non-homologous end-joining (3)
ko00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism (3)
ko00620 Pyruvate metabolism (3)
ko05202 Transcriptional misregulation in cancer (3)
ko00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (3)
ko00521 Streptomycin biosynthesis (2)

ko00100 Steroid biosynthesis (2)
ko02020 Two-component system (2)
ko00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes (2)
ko00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (2)
ko05010 Alzheimer's disease (2)
ko04923 Regulation of lipolysis in adipocytes (2)
ko00590 Arachidonic acid metabolism (2)
ko00052 Galactose metabolism (2)
ko00400 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (2)
ko00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism (2)
ko04071 Sphingolipid signaling pathway (2)
ko00524 Butirosin and neomycin biosynthesis (2)
ko00565 Ether lipid metabolism (2)
ko00982 Drug metabolism - cytochrome P450 (1)
ko00670 One carbon pool by folate (1)
ko00140 Steroid hormone biosynthesis (1)
ko00040 Pentose and glucuronate interconversions (1)
ko05203 Viral carcinogenesis (1)
ko04932 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (1)
ko00232 Caffeine metabolism (1)
ko04530 Tight junction (1)
ko00280 Valine, leucine and isoleucine degradation (1)
ko04930 Type II diabetes mellitus (1)
ko05016 Huntington's disease (1)
ko00980 Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (1)
ko00830 Retinol metabolism (1)
ko04950 Maturity onset diabetes of the young (1)
ko04142 Lysosome (1)
ko04070 Phosphatidylinositol signaling system (1)
ko00430 Taurine and hypotaurine metabolism (1)
ko04973 Carbohydrate digestion and absorption (1)
ko04964 Proximal tubule bicarbonate reclamation (1)
ko04066 HIF-1 signaling pathway (1)
ko00591 Linoleic acid metabolism (1)
ko04922 Glucagon signaling pathway (1)
ko04260 Cardiac muscle contraction (1)
ko05204 Chemical carcinogenesis (1)
ko05206 MicroRNAs in cancer (1)
ko00770 Pantothenate and CoA biosynthesis (1)
ko05012 Parkinson's disease (1)
ko04068 FoxO signaling pathway (1)
ko04626 Plant-pathogen interaction (1)
ko00340 Histidine metabolism (1)
ko04917 Prolactin signaling pathway (1)
ko04911 Insulin secretion (1)
ko04550 Signaling pathways regulating pluripotency of

stem cells (1)
ko04146 Peroxisome (1)
ko00053 Ascorbate and aldarate metabolism (1)
ko04910 Insulin signaling pathway (1)
ko05230 Central carbon metabolism in cancer (1)
ko05231 Choline metabolism in cancer (1)

ko00460 Cyanoamino acid metabolism (1)
ko00450 Selenocompound metabolism (1)
ko00592 alpha-Linolenic acid metabolism (1)
ko04977 Vitamin digestion and absorption (1)
ko03320 PPAR signaling pathway (1)

6.3 Variabilidad Ambiental Historia de la ciudad de Viña del Mar, Región de Valparaíso, Chile.

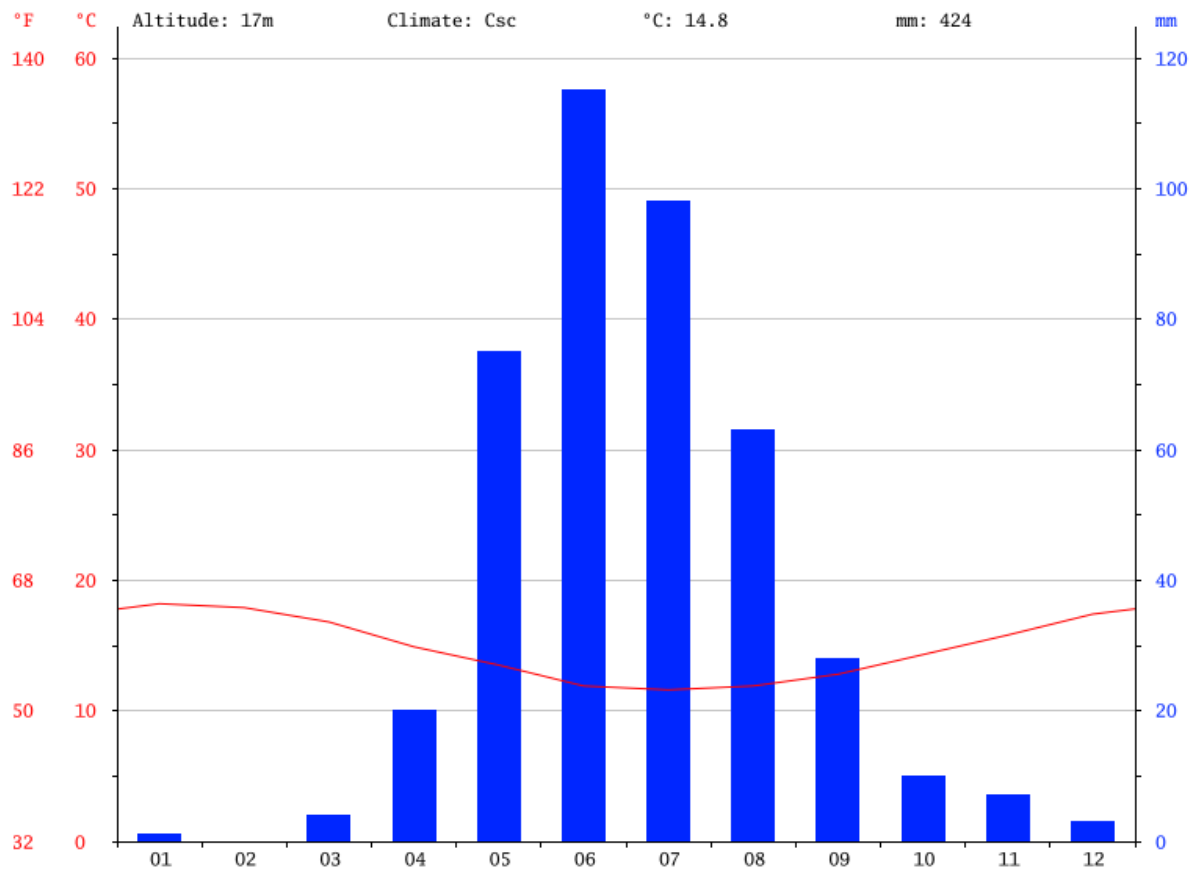


Figura 10: Climatograma ciudad de Viña del Mar. Datos mostrados son el promedio entre los años 1982 hasta el año 2012. Climate-Model y Climate-Data.org, localización geográfica obtenida por OpenStreetMap proyect.

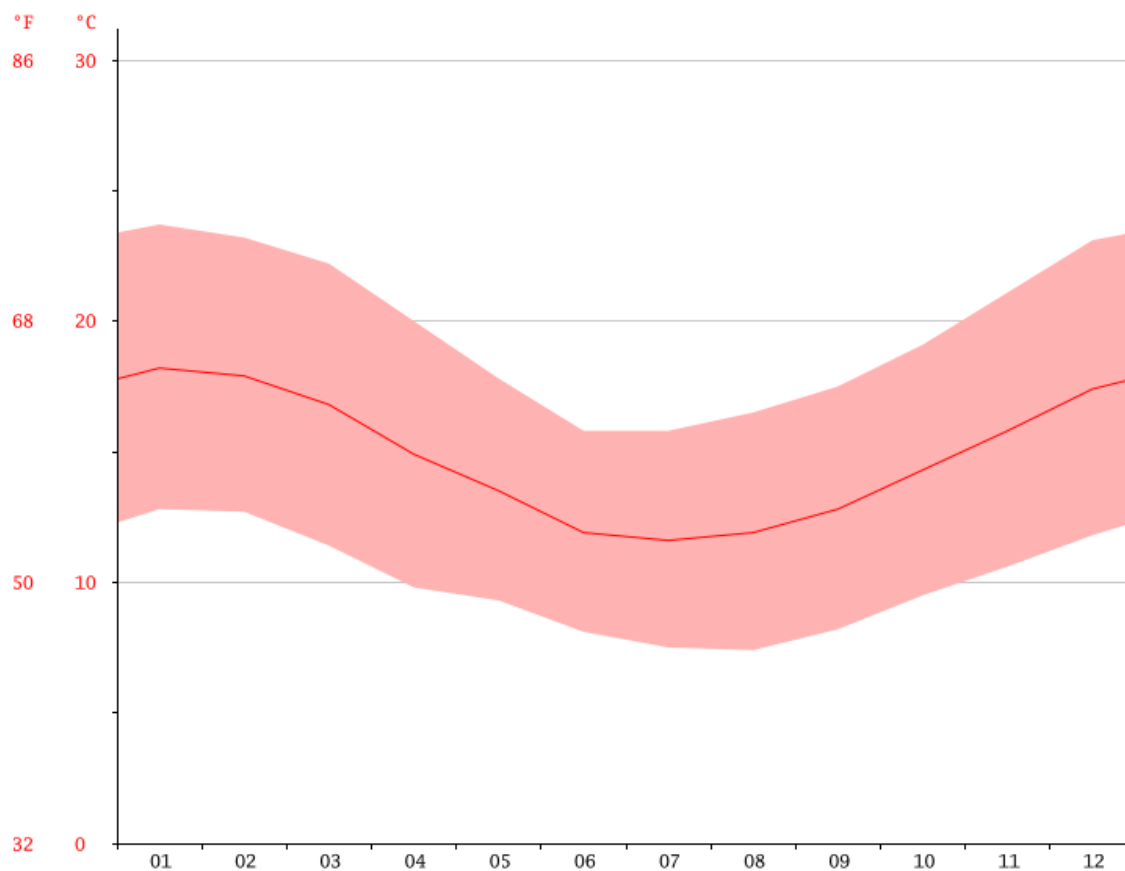


Figura 11: Diagrama de temperatura de la ciudad de Viña del Mar. Datos mostrados son el promedio entre los años 1982 hasta el año 2012. Climate-Model y Climate-Data.org, localización geográfica obtenida por OpenStreetMap project.